Aus der Medizinischen Universitäts-
klinik Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek)

Pathogenese und Beeinflußbarkeit der Glycogenolyse bei akuter Urämie: Untersuchung am Modell eines aus Skelettmuskulatur der Ratte isolierten und charakterisierten Protein-Glycogen-Komplexes

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximillians-Universität Würzburg
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Roland Michael Schäfer
aus Würzburg

Würzburg, den 12.12.1980

1981

Aus der Medizinischen Universitäts-
klinik Würzburg
(Direktor: Prof.Dr. K. Kochsiek)

Pathogenese und Beeinflußbarkeit der Glycogenolyse bei akuter Urämie: Untersuchung am Modell eines aus Skelettmuskulatur der Ratte isolierten und charakterisierten Protein-Glycogen-Komplexes

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximillians-Universität Würzburg
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Roland Michael Schäfer
aus Würzburg

Würzburg, den 12.12.1980

Referent:	Prof. Dr. A. Heidland
Korreferent:	Prof. Dr. K. Kochsiek
Dekan:	Prof. Dr. K. H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 2. 1981

Gedruckt mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. Einleitung

1. 1. physiologischer Glycogenmetabolismus der Muskelzelle 1

1. 2. Glycogenmetabolismus im Postaggressionsstoffwechsel und bei Urämie 5

1. 3. Ziele der vorliegenden Arbeit 7

2. Methoden

2. 1. operatives Vorgehen 10

2. 2. präperative Methoden 12

2. 3. analytische Methoden 13

3. Ergebnisse

3. 1. Präperation des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten 22

3. 2. Präperation des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur chronich-urämischer Ratten 24

Seite

3. 3. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Substitution einer hochkalorischen proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser 26

3. 4. Gewinnung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Verfütterung einer hochkalorischen proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und zusätzlicher Gabe von Propanolol 28

3. 5. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Verfütterung einer hochkalorischen proteinarmen Kost in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser 30

3. 6. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer proteinarmen hochkalorischen Diät mit Zusatz des Ketosäurengemisches nach Walser und einer gleichzeitigen Gabe von Propanolol 32

3. 7. Präparation eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer gemischten proteinarmen Kost, Ketosäuren nach Walser, Propanolol und hoher Serindosen 36

3. 8. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution hoher Dosen an Ketosäuren in Kombination mit gemischter proteinarmer hochkalorischer Kost und Gabe von Propnolol 38

3. 9. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer gemischten proteinarmen Diät in Kombination mit Propanolol und gleichzeitiger isolierter hoher Serindosierung 40

3. 10. Gesamtglycogenmenge der 30-P-Fraktion pro Calcium-ATPase als Maßzahl 42

3. 11. Beziehung zwischen Phosphorylase-Phosphatase Aktivität zum Protein-Glycogen-Komplex bei akuter Urämie und nach Scheinoperation 45

3. 12. Blitzaktivierung der Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex 48

3. 13. Effekt verschiedener ATP-Konzentrationen auf die b- zu a-Konvertierung der Phosphorylase 52

3. 14. Unterschied der Blitzaktivierung von Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex zum einen, isoliert aus Skelettmuskulatur unbehandelter Ratten zum anderen, isoliert aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kaninchen 55

3. 15. Identifizierung der Komponenten des Protein-Glycogen-Komplexes mittels SDS-Gelelektrophorese 58

4. Diskussion 62

5. Zusammenfassung 69

6. Literaturverzeichnis 73

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0056

1. E I N L E I T U N G

1.1. Aufbau und Abbau des Glycogens in der Muskelzelle

Das Polysaccharid Glycogen stellt eine Speicherform überschüssig zugeführter Glucose dar. Glycogen findet sich in fast allen Zellen des Körpers, besonders aber in Muskel und Leber. Das Molekulargewicht wird mit etwa 10^6 angegeben, entsprechend etwa 5×10^4 Glucoseeinheiten. Die einzelnen Glucosemoleküle können in 1-4 und in 1-6 -Bindung verknüpft sein, so daß ein stark verzweigtes Glycogenmolekül entsteht. Vorteil dieser hochpolymeren Speicherform ist, daß sie, verglichen mit freien Glucosemolekülen, nur eine geringe osmotische Wirkung entfaltet.

Die Synthese dieses Polysaccharides wird durch eine Glycogensynthetase katalysiert:

$$\text{UDP - Glucose} + \text{Glycogen}_{(n)} \rightleftharpoons \text{Glycogen}_{(n+1)} + \text{UPD}$$

Dabei wird die Aktivität dieses Enzyms mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert (1).

Das phosphorylierte Enzym wird als D-Form (engl. dependent: abhängig von der Glucose-6-P-Konzentration als allosterischer Aktivator) bezeichnet, die unter physiologischen Bedingungen weitgehend inaktiv ist.

Das dephosphorylierte Enzym wird als I-Form (engl. independent: unabhängig) bezeichnet, die unter physiologischen Bedingungen als aktive Form des Enzyms anzusehen ist.

Die Phosphorylierung wird durch eine Proteinkinase, die Dephosphorylierung durch eine Proteinphosphatase katalysiert.

Der Abbau des Polysaccharides Glycogen wird durch Glycogenphosphorylase katalysiert, die folgendes Gleichgewicht einstellt (1).

$$\text{Glycogen}_{(n)} + \text{Pa} \rightleftharpoons \text{Glycogen}_{(n-1)} + \text{Glucose-1-P}$$

Wie die Synthetase, so wird auch die Phosphorylase-Aktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflußt, nur in gegensätzlichem Sinn:

So führt die Phosphorylierung des Enzyms zu einer Steigerung der Aktivität. Die phosphorylierte Form wird als Phosphorylase a (a = aktiv) bezeichnet.

Die Dephosphorylierung führt zu einer Inaktivierung des Enzyms. Diese inaktive Form wird als Phosphorylase b bezeichnet. Sie ist allosterisch durch AMP aktivierbar (1).

Die Phosphorylierung der Phosphorylase erfolgt durch Übertragung eines P-Restes von ATP auf einen Serinrest des Enzyms. Dadurch kommt es zur Aggregation der dimeren Phosphorylase (MG 185 000) zur tetrameren Phosphorylase a.

Vermittelt wird diese Reaktion durch das Enzym Phosphorylase-Kinase. Die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung wird wiederum durch eine Proteinphosphatase katalysiert, möglicherweise dieselbe Proteinphosphatase, die die Aktivierung der Synthetase vermittelt (2).

Die Phosphorylase-Kinase unterliegt wiederum einer zweifachen Kontrolle:

- durch Phosphorylierung mittels einer cAMP-abhängigen Proteinkinase
- durch Erhöhung des intracellulären Ca^{2+}-Spiegels von 10^{-8} auf 10^{-6} M parallel mit der Muskelkontraktion (1).

Die Phosphorylierung der Phosphorylase-Kinase durch die Proteinkinase führt zur Aktivierung des Enzyms und damit letztlich zur Degradierung des Polysaccharids Glycogen. Dieselbe Proteinkinase inaktiviert durch Phosphorylierung auch die Synthetase.

Diese Proteinkinase unterliegt ihrerseits der allosterischen Kontrolle durch die Konzentration des intracellulären cAMP. Diese Substanz überträgt als "second messenger" die Hormonwirkung (Adrenalin, Glucagon) auf das Zellgeschehen (1).

Somit unterliegt die Aktivierung der Glycogenolyse und letztlich die Energiebereitstellung der Kontrolle der Hormone Adrenalin und Glucagon.

Ein zweiter Weg der Phosphorylase-Kinase-Aktivierung existiert in der Muskelzelle. Dort ist dieses Enzym nicht nur durch Phosphorylierung, sondern auch durch Ca^{2+} aktivierbar.
Der Anstieg der intracellulären Ca^{2+}-Konzentration von 10^{-8} auf 10^{-6} M löst nicht nur eine Degradierung des Glycogens und damit die Bereitstellung von ATP aus, sondern steuert gleichzeitig auch die Regulation der kontraktilen Proteine (3).

In Ruhe beträgt die Ca^{2+}-Konzentration innerhalb einer Muskelzelle etwa 10^{-8} M durch die Pumpenleistung des sarkoplasmatischen Reticulums. (4).
Wird durch einen nervalen Impuls das Sarkolemm depolarisiert, wird diese Depolarisierung über das quer verlaufende T-System auf das longitudinal verlaufende sarkoplasmatische Reticulum übertragen.

Dieses Longitudinal-System der Muskelzelle stellt das Kompartiment der Ca^{2+}-Speicherung in Muskelruhe dar. Jede Depolarisierung löst eine Permeabilitätsänderung für Ca^{2+} aus, im Sinne eines vermehrten Ca^{2+}-Ausstroms mit Erhöhung der intracellulären Ca^{2+}-Konzentration.

Eine Steigerung der Ca^{2+}-Konzentration auf 10^{-6} M führt zur Muskelkontraktion: Ca^{2+} wird an die Untereinheit TNC (= Calciumbindungsseite) des Troponins gebunden. Dadurch bewegen sich Tropomyosin und TNI (= Inhibitorkomponente) aus der Hemmposition für eine Aktin-Myosin-Interaktion.
Es kommt zur Ausbildung von Querbrücken zwischen Myosin und Aktin unter ATP-Spaltung und somit zur Kontraktion (5).
Synchron zu dieser Aktivierung der Muskelkontraktion kommt es über eine Aktivierung der Glycogenolyse zu einer Resynthese des verbrauchten ATP (1).

1.2. Glycogenmetabolismus im Postaggressionsstoffwechsel und bei Urämie

Bereits am zweiten Tag nach Einwirken eines Traumas, sei es durch Unfall oder Operation, kommt es beim Menschen im Rahmen des Postaggressionsstoffwechsels zum Absinken des Muskelglycogens (6). In der Erholungsphase kommt es dann wieder zu einem allmählichen Aufstocken der Glycogenreserven.

Besonders ausgeprägt ist eine Degradation des Muskelglycogens auf ca. 30% der Norm postoperativ in Kombination mit einem akuten Nierenversagen (7). Aus Tierexperimenten an Ratten ist bekannt, daß bereits 20 Stunden nach Binephrektomie der Glycogengehalt des Muskels von 1-2 µg/mg (Glycogen/Protein) auf 0.1 - 0.2 µg/mg, also auf 10% der Norm, abgesunken ist (8).
Parallel mit einer Aktivierung der Phosphorylase kommt es dabei zu einer starken Hemmung der Glycogen-Synthetase (8).

1.2.1. 5 Hypothesen zur Erklärung der vermehrten Glycogenolyse im Skelettmuskel bei Urämie und im Postaggressionsstoffwechsel:

1.2.1.1. In einer urämischen Stoffwechselsituation liegt eine relative Insulinresistenz vor (9).
Diskutiert werden das Auftreten Insulin antagonistisch wirkender Metabolite und eine veränderte Insulinrezeptorempfindlichkeit.

1.2.1.2. In urämischen und postaggressionellen Stoffwechselsituationen finden sich erhöhte Serumkonzentrationen des Hormons Adrenalin. Damit unterliegt die Muskelzelle einer vermehrten beta-adrenergen Stimulation. Die intracelluläre Konzentration des second messenger cAMP ist erhöht (10), parallel die Glycogenolyse aktiviert (11).

1.2.1.3. Eine Beeinflussung des Glycogenstoffwechsels könnte durch strukturelle Veränderungen der kontraktilen Proteine erfolgen. Untersucht wurde bei akuter Urämie das Troponin (11).

Man kann 3 Untereinheiten unterscheiden:

TNC: die Ca^{2+} -bindende Komponente
TNT: die an Troponin bindende Komponente
TNI: die inhibitorische Komponente (3)

Bei akuter Urämie ist die inhibitorische Komponente des Troponins in der Muskelzelle stark erniedrigt. Daraus könnte eine unkontrollierte Aktin-Myosin-Interaktion resultieren mit vermehrtem ATP-Verbrauch und konsekutiver Steigerung der Glycogenolyse zur ATP-Resynthese (11).

1.2.1.4. Eine Aktivierung der Glycogenolyse bei akuter Urämie könnte durch eine Ca^{2+}-Aktivierung der Phosphorylase-Kinase bedingt sein. Ein vermehrter Ca^{2+}-Efflux aus urämischen Vesikeln des sarkoplasmatischen Reticulums ist mitgeteilt. (12).

1.2.1.5. Eine vermehrte Glycogenolyse unter urämischer oder postaggressioneller Stoffwechselsituation könnte letztlich auch durch eine proteolytische Aktivierung

Mißt man hingegen Enzymaktivitäten im Rohextrakt, so benötigt man zur halbmaximalen Aktivierung Effektorkonzentrationen, die die intracellulären um etwa Faktor 100 übertreffen.

Der Protein-Glycogen-Komplex wurde aus Rattenmuskulatur isoliert, da nur das Tierexperiment genügend Muskelmasse liefert, um ausreichend Protein-Glycogenkomplex isolieren zu können. Um ca. 150 mg Protein-Glycogen-Komplex zu erhalten, muß man von ca. 150 g Muskulatur ausgehen.

1.3.2. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes unter den Bedingungen:

1. Physiologischer Stoffwechsel
2. Akut und chronisch urämischer Stoffwechsel
3. Postoperativer Stoffwechsel

1.3.2.1. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes unter physiologischen Stoffwechselverhältnissen:

Aus der Muskulatur völlig gesunder Tiere präpariert man einen Protein-Glycogen-Komplex.
Dieser Partikel ist charakterisiert durch seine verschiedenen enzymatischen Aktivitäten und seinen Gehalt an Glycogen und Protein.
Das Studium dieses Komplexes liefert somit Daten, die für die physiologische Situation in der Muskelzelle der Ratte typisch ist.

1.3.2.2. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes unter urämischer Stoffwechselsituation

Aus der Muskulatur vom urämischen Tier wird ein Protein-Glycogen-Komplex isoliert, bzw. es wird versucht zu isolieren.
Durch diätische und medikamentöse Maßnahmen soll versucht werden, Ausbeute, Zusammensetzung und enzymatisches Verhalten des Protein-Glycogen-Komplexes zu variieren.

1.3.2.3. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes unter einer Stoffwechselsituation, wie sie post operationem gegeben ist

Dazu wird ein Protein-Glycogen-Komplex aus scheinoperierten Tieren isoliert, um die Auswirkung des operativen Stresses auf den Glycogenmetabolismus erfassen zu können.

1.3.3. Diätetische und medikamentöse Beeinflußbarkeit des Glycogenstoffwechsels bei Urämie und operativem Streß

Ausgehend von Untersuchungen von Walser wurde die proteinarme, hochkalorische Diät kombiniert mit einem Gemisch von essentiellen Aminosäuren und deren Ketoanaloge. Um die Frage einer Katecholaminauswirkung auf den Glycogenstoffwechsel zu prüfen, wurde der beta-Blocker Propanolol appliziert. Die Aminosäure Serin hat sich als außerordentlich günstiges Substrat für die Stimulation der Glycogensynthese bei Urämie erwiesen (8). Deshalb sollte hier der Effekt auf die Zusammensetzung des Protein-Glycogen-Komplexes untersucht werden.

2. M E T H O D E N

2.1. Verschiedene operative Möglichkeiten zur Erzeugung einer urämischen Stoffwechselsituation, Scheinoperation zur Stimulation des OP-Stresses, medikamentöse und diätetische Beeinflußbarkeit.

2.1.1. Binephrektomie

Die Tiere werden mittels Äther narkotisiert. Der Zugang zu beiden Nieren erfolgt von dorsal. Mit einem medianen Hautschnitt stellt man sich die abdominelle Muskulatur dar. Beidseits wird das Abdomen von dorsal durch zwei paravertebrale Schnitte eröffnet. Nach Darstellung der Nieren erfolgt deren Dekapsulierung, um die Nebennieren zu erhalten. Dann führt man die Ligatur des Gefäß- und Ureterstiels durch. Die Nieren werden abgetrennt. Die beiden Muskelschnitte und der mediane Hautschnitt werden vernäht.

2.1.2. Beidseitige Ureterligatur

Die Darstellung von Niere und Ureter erfolgt auf dem gleichen Wege wie bei der Binephrektomie. Man präpariert den Ureter frei und unterbindet ihn. Die Nieren und ihre Gefäßversorgung bleiben dabei intakt. Diese beidseitige Ureterligatur läßt rasch eine doppelseitige Hydronephrose mit konsekutiver Urämie entstehen.

2.1.3. 90% -ige Resektion der Nieren

Sie wird angewendet, um eine chronische urämische Stoffwechselsituation zu erzeugen.
Beide Nieren werden nach der oben genannten Methode dargestellt (Punkt 2.1.1.).
Eine Niere wird unter Schonung der Nebenniere und nach Ligatur des Gefäß-Ureterstiels entfernt.
Die zweite Niere wird dekapsuliert und jeweils das obere und untere Drittel der Niere wird reseziert. Die Wundflächen werden mit dem Elektrocauter verschorft, um einen größeren Blutverlust zu vermeiden. Da es in den folgenden Wochen zu einer funktionellen Hyperplasie des Nierenstumpfes kommt, wird dieser nach etwa 2 Wochen nochmals mit dem Elektrocauter nachreseziert.

2.1.4. Scheinoperation zur Simulation des OP-Stresses

Beide Nieren werden nach der unter Punkt 2.1.1. angeführten Methode dargestellt. Sie werden dekapsuliert. Eine Ligatur des Gefäß-Ureterstiels unterbleibt jedoch. Muskel- und Hautschnitte werden vernäht. Die Tiere entwickeln keine Urämie.

2.1.5. Therapeutische Maßnahmen in der postoperativen Phase

Die Tiere werden in Einzelkäfigen gehalten. Alle operierten Tiere erhalten mittels einer Schlundsonde im Abstand von 8 Stunden eine spezielle Diät.
Basis dieser Diät bildet eine hochkalorische proteinarme Sondennahrung ("MLPD" = mixed low protein diet). Dazu werden je nach Versuch verschiedene Konzentrationen an essentiellen Aminosäuren und Ketosäuren nach

Walser (15) sowie Serin gefüttert.
Medikamentös wurden die operierten Tiere mit einem beta-Rezeptorenblocke (Propanolol, 2,5 mg/kg/24 h s.c.) behandelt.

2.2. Präparation des Protein-Glycogen-Komplexes nach Meyer et al. (16)

Die Versuchstiere werden in Äthernarkose getötet: Chronisch urämische Tiere nach ca. 8 Wochen, akut urämische Tiere und scheinoperierte Ratten 60 Stunden nach Operation.

Die getöteten Tiere werden 15 Minuten in Eiswasser gekühlt, um die Aktivität lysosomaler Enzyme und die Glycogenolyse zu hemmen. Dann wird das Muskelfleisch von den Hinterläufen abpräpariert und in Eis verwahrt.
Alle weiteren Schritte erfolgen nun im auf $4^{\circ}C$ temperierten Kälteraum. Das Muskelfleisch wird durch einen Fleischwolf gedreht und gewogen. Man gibt das 1.5 -fache einer 4 mM EDTA-Lösung (pH 7.0) hinzu und homogenisiert diese Muskelsuspension eine Minute im Warring Blendor.
Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 40 Minuten bei $0^{\circ}C$ und 4000 x g. Der Überstand wird über Glaswolle abfiltriert, um Fettgewebe zurückzuhalten.
Bei richtigem Vorgehen hat dieser Rohextrakt einen pH zwischen 6.5 -6.8 .
Nun erfolgt die Säurefällung durch tropfenweises Zugeben von kalter 1 N Essigsäure bis zu einem pH zwischen 6.1 - 6.0 .

Man inkubiert 10 Minuten bei $0^{o}C$ zur Präzipitation von Protein. Anschließend erfolgt Zentrifugation bei $0^{o}C$ für 30 Minuten und 4000 x g.
Man erhält den sogenannten Säurefällungsniederschlag, der im gleichen Volumen Puffer (0.1 M Na-Glycero-Phosphat 1 mM EDTA, pH 7.2, aufgenommen wird, füllt danach mit dem Puffer auf 50 ml auf und homogenisiert.
Das Homogenisat wird bei $0^{o}C$ 90 Minuten mit 80 000 x g zentrifugiert . Da dieser Zentrifugationsschritt in einer Ultrazentrifuge bei 30 000 rpm erfolgt, wird der so erhaltene Niederschlag (engl. pellet) als 30-P bezeichnet. Der Niederschlag (30-P) wird im 1.5 -fachen Volumen Puffer (50 mM Na-Glycero-Phosphat, 1mM EDTA, pH 6.8) aufgenommen und homogenisiert.

Bei jedem Isolierungsschritt werden Aliquote von je 1 ml für eine Reinigungstabelle entnommen.

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (17)

Reagenz A: 48 ml 2% Na_2-CO_3 in 0.1 N NaOH werden mit einer 1% Na-K-Tartrat versetzt, dann wird 1 ml 0.5% -ig $CuSO_4$ x 5 H_2O dazugegeben.

Reagenz B: Folin-Reagenz wird 1:2 mit aqua dest. verdünnt.

Durchführung: 0.5 ml Probe werden mit 5 ml Reagenz A vermischt. Inkubation für 10 Minuten bei Zimmertemperatur.

Dann werden 0.5 ml Reagenz B hinzugegeben. Wiederum Inkubation für 10 Minuten bei Zimmertemperatur.
Messung der Extinktion bei 750 nm.

Leerwert: 0.5 ml aqua dest. + 5 ml Reagenz A + 0.5ml Reagenz B.

Berechnung: Die Berechnung der Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben erfolgt mittels einer Eichkurve von 50 - 500 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA).

2.3.2. Glycogen modifiziert nach Montgomery (18)

Zu 0.5 ml Probe werden 0.5 ml 10% TCA (Trichloressigsäure) dazugegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, um das Protein der Probe zu denaturieren.

Das Präzipitat wird für 10 Minuten bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 95% Äthanol (4°C) bis zu einer Endkonzentration von 66% versetzt und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Das durch Alkohol präzipitierte Glycogen wird bei 3000 x g 10 Minuten abzentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und der Niederschlag in 2 ml aqua dest. aufgenommen.

Dann werden 0.2 ml 40% Phenol und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben. Nachdem die Farbentwicklung nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur abgeschlossen ist, wird bei einer Wellenlänge von 490 nm die Extinktion gemessen.

Als Leerwert werden 2 ml H_2O + 0.2 ml Phenol + 5 ml H_2SO_4 verwendet. Zur Berechnung der Glycogenkonzentration in den einzelnen Proben wird eine Glycogeneichkurve von 10 - 100 µg/ml erstellt.

2.3.3. Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow (19)

0.1 ml Probe und 0.1 ml aqua dest. bzw. Puffer werden zu 4.5 ml Stop-Reagenz (7.5 g Ammoniummolybdat, 2.7 ml 10% SDS, 42 ml konzentrierte H_2SO_4, H_2O ad 2700 ml) gegeben, dann werden 0.25 ml ANSA (148.7 g $NaHSO_3$, 5.0 g Na_2SO^3, 1.5 g ANSA ad 4 l aqua dest.) hinzupipettiert.
Zur Farbentwicklung läßt man den Ansatz 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Hernach wird die Extinktion bei 578 nm gemessen.

Leerwert: 0.2 ml H_2O + 4.5 ml Stop-Lösung + 0.25 ml ANSA.

Als Standard dient eine 1.6 mM Phosphatlösung.

2.3.4. Aktivitätsbestimmung der Phosphorylase nach Hedrick und Fischer (20)

Bestimmung der Phosphorylase b:

Zu 0.1 ml Probe (verdünnt in 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 50 mM NaF, pH 6.8) werden 0.1 ml CT-Substrat (0.1 M Na-Maleat, pH 6.8, 2% Glycogen, 0.15 M Glucose-1-P) dazugegeben.

Bestimmung der Phosphorylase a:

Zu 0.1 ml Probe werden 0.1 ml ST-Substrat dazugegeben (0.1 M Na-Maleat,pH 6.8, 2% Glycogen (AMP frei), 0.15 M Glucose-1-P).

Beide Ansätze werden für 5 Minuten bei 30°C inkubiert, dann wird die Reaktion durch Zugabe von 4.5 ml Stop-Reagenz unterbunden. Das aus Glucose-1-P frei werdende Phosphat wird nach der Methode von Fiske und Subbarow (19) bestimmt.

2.3.5. Glycogensynthetase nach Thomas et al. (21)

Folgende Reagenzien finden Verwendung:

A: 3.75 mM ^{3}H-UDP-Glucose: 21.2 mg UDP-Glucose auf 10 ml aqua dest. + 0.1 ml ^{3}H-UDP-Glucose.

B: Stammlösung zur Bestimmung der Synthetase-Gesamtaktivität: (D + I-Form)

4 ml 10% Glycogen
4 ml 0.625 M Tris/HCl, 0.0125 M EDTA, 0.156 M $MgCl_2$, pH 7.6
2 ml 0.0625 M Glucose-6-P

C: Stammlösung zur Bestimmung der Synthetase I:

4 ml 10% Glycogen
4 ml 0.625 M Tris/HCl, 0.0125 M EDTA, 0.156 M $MgCl_2$, pH 7.6
2 ml aqua dest.

Ansatz:

100ul Lösung A werden mit 50µl Probe und 20 µl Lösung B bzw. Lösung C inkubiert. Nach 10 Minuten werden 50 µl auf Whatman Filterplättchen gegeben. Die Plättchen werden danach in ein Spülbad (66% Äthanol, 4°C) getaucht und für 20 Minuten dort belassen.
Dann wird die Äthanollösung gewechselt und die Plättchen für weitere 10 Minuten inkubiert.
Hernach kommen die Plättchen für 5 Minuten in Aceton. Die Plättchen werden getrocknet, kommen in Szintillationsgläschen, werden mit je 5 ml Rotiszint 11 versetzt und die Aktivität der einzelnen Proben in einem Liquid-Szintillation-Counter bestimmt. Als Totalwert werden 50 µl Lösung A auf ein Filterplättchen gegeben.

2.3.6. Ca^{2+} -ATPase-Aktivitätsbestimmung nach De Meis und Hasselbach (22), modifiziert nach Hörl et al. (23)

Reagenzien:

ATPase-Mix: 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Kcl,
1.5 mM EGTA

Ansatz:

1.9 ATPase-Mix werden nach Zugabe von Vesikeln (Protein-Endkonz: 0.1 mg/ml) bei 30°C im Wasserbad für 1 Minute inkubiert. Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 0.1 ml 0.1 M ATP. Nach 2 und 4 Minuten werden Aliquots von 0.2 ml in 0.2 ml 20% SDS abgestoppt. In der 5. Minute werden 10 µl 0.2 M $CaCl_2$ (Endkonz: 1.25 mM) dazugegeben.

Zum Zeitpunkt 5'30", 6', 6'30" werden Aliquots wiederum in 0.2 ml 20% SDS abgestoppt. In der 7. Minute werden 20 µl Oxalat 0.2 M (Endkonz: 4 mM) dazupipettiert.

Zum Zeitpunkt 7'30", 8', 9', 10' werden wiederum Aliquots von je 0.2 ml in 0.2 ml 20% SDS abgestoppt. Die Bestimmung des Phosphats im gestoppten Ansatz erfolgt nach der unter 2.3.3. angegebenen Methode.

2.3.7. Die Bestimmung von Phosphorylase-Kinase erfolgte automatisiert nach Jennissen und Heilmeyer (24)

2.3.8. Bestimmung der Phosphorylase-Phosphatase nach Hurd und Fischer (27)

0.1 ml Probe (Verdünnungen in 50 mM Tris/HCl, 20 mM ME, pH 7.5) werden mit 0.1 ml Phosphorylase a - ^{32}P (2.5 mg/ml) bei 30°C für 15 Minuten inkubiert.
Nach Zugabe von 0.1 ml Rinderserumalbumin (25 mg/ml) wird die Reaktion durch Zugabe von 0.7 ml 10% TCA abgestoppt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4°C wird der Niederschlag bei 3000 x g abzentrifugiert.
0.5 ml des Überstandes werden in 5 ml Szintillationslösung (21.84 g PPO, 2.16 g Bis-MSB, 375 Naphtalin, 3 l Dioxan) gezählt.

Als Leerwert dienen 0.5 ml Überstand nach Verwendung von 0.1 ml Puffer als Probe. Der Niederschlag dieser Probe wird in 1 ml konzentrierter Ameisensäure aufgenommen, 0.5 ml dieser Lösung dienen als Totalwert.

Phosphorylase a - ^{32}P wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heilmeyer (Physiologische Chemie, Ruhruniversität Bochum) zur Verfügung gestellt.

2.3.9. Reversible Blitzaktivierung der Glycogenphosphorylase nach Heilmeyer (25)

Reagenzien:

- 30 P-Suspension in Glycero-Phosphat EDTA-Puffer (50/1 mM, pH 6.8)
- $MgCl_2$, 100 mM
- $CaCl_2$, 40 mM
- ATP 50/40/30/20 mM

- Verdünnungspuffer:
  50 mM Glycero-Phosphat, pH 6.8
  Mercaptoäthanol 40 mM
  Rinderserumalbumin 1 mg/ml
  EDTA 1.0 mM

Ansatz:

460 µl 30 P-Suspension werden mit 25 µl $MgCl_2$, 100 mM (Endkonz: 5 mM) bei 30°C im Wasserbad inkubiert.
Zum Zeitpunkt 0' werden 10 µl ATP 50 mM (Endkonz: 1 mM) dazugegeben.
Alle 15 Sekunden werden Aliquots zu 20 µl (insgesamt 6) in 2 ml Verdünnungspuffer abgestoppt.

Zum Zeitpunkt 1'45" werden 10 µl 40 mM $CaCl_2$ und gleichzeitig 10 µl 40 mM ATP (jeweilige Endkonz: 1 mM) dazupipettiert.
Zu den Zeitpunkten 2', 2'15", 3', 4', 5', 6'30" werden Aliquots zu 20 µl entnommen und in 2 ml Verdünnungspuffer abgestoppt.

Zum Zeitpunkt 6'45" werden 10 µl ATP (30 mM) dazugegeben.
Zu den Zeitpunkten 7', 7'15",8', 9', 10', 11'30" werden wiederum Aliquots zu 20 µl in 2 ml Verdünnungspuffer abgestoppt.

Zum Zeitpunkt 11'45" werden noch einmal 10 µl ATP 20 mM hinzugegeben.

Zu den Zeitpunkten 12', 13', 14', 15', 16'30" werden Aliquots zu 20 µl entnommen und in 2 ml Verdünnungspuffer abgestoppt.

Die Aktivität der Phosphorylase a der einzelnen Proben wird danach wie angegeben bestimmt (2.3.4.)

2.3.10. SDS-Gel-Elektrophorese nach Weber und Osborn (26)

Reagenzien:

A. ad 100 ml aqua dest.: 22.2 g Acrylamid 0.6 g MBA (Methylen-bis-Acrylamid)

B. ad 4 ml aqua dest.: 60 mg Ammoniumpersulfat

C. ad 500 ml aqua dest: 28.5 ml 1 M NaH_2PO_4
145 ml 0.5 M Na_2HPO_4
10 ml SDS 10%

D. Temed

Denaturierungspuffer:

1% SDS, 10 mM Na_2HPO_4, 1% Mercaptoäthanol, 10% Glycerol, 0.002% Bromphenolblau, pH 7.2

Färbelösung: 625 mg Coomassieblue
227 ml 50% Methanol
23 ml Eisessig 10%

Entfärbelösung: 227 ml 50% Methanol
23 ml Eisessig 10%

Ansatz:

Gießen der Gele:

4.5 ml Lösung A und 10 ml Lösung C und 20µl Lösung D und 4.5 ml aqua dest. werden zusammen pipettiert. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wird der Ansatz unter Schütteln entgast bis eine Blasenbildung unterbleibt. Erst jetzt werden 1 ml Lösung B dazugegeben. Dieses Gemisch wird in normierte Gelröhrchen gegossen und mit 50 µl aqua dest. überschichtet.

Denaturierung des Proteins:

Die jeweilige Proteinprobe wird auf die Konzentration von 1 mg/ml verdünnt.
Jeweils 20 ul und 40 ul einer solchen Probe werden zu 50 ul Denaturierungspuffer gegeben. Dieses Gemisch wird für 3 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend auf je ein Gelröhrchen gegeben.

Auftrennung der Proteine:

Die Elektrophorese wird mit 8 mA/Gel ausgeführt.
Die Laufzeit bei Zimmertemperatur beträgt ca. 4 Stunden.

Färbung und Entfärbung:

Die Gele werden vorsichtig aus den Gelröhrchen herausgelöst und anschließend 1-2 Stunden mit Färbelösung gefärbt.
Die Entfärbung der Gele erfolgt über mehrere Tage unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung.

Messung:

Die Proteinbanden werden densitometrisch bei einer Extinktion von 550 nm ausgewertet.

2.3.11. Die Bestimmung von Harnstoff-N erfolgte automatisiert nach Routinemethoden

3. E R G E B N I S S E

3.1. Präparation des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten

Aus Skelettmuskulatur von sieben unbehandelten Kontrolltieren mit einem mittleren Harnstoff-N von 16.5 mg/dl wurde nach Meyer et al. (16) der Protein-Glycogen-Komplex isoliert.

Tab. 1 zeigt das Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase und Calcium-ATPase während der einzelnen Reinigungsschritte.
Dabei werden 98% des im Rohextrakt enthaltenen Proteins während der Isolierung entfernt. Bei einer Gesamtglycogenmenge von 35.4 mg in 187 ml Rohextrakt finden sich in der 30-P-Fraktion 47% des Glycogens. Somit steigt der Glycogen-Protein-Quotient von 7.8 ug/mg auf 167 ug/mg.
Betrachtet man das Verhalten der Phosphorylase, so kommt es bei diesem Enzym zu einer Ausbeute von 4% in der 30-P-Fraktion bei einem Anteil von 10% aktiver a-Form.
Die Glycogen-Synthetase (aktive I-Form) läßt sich mit einer Ausbeute von 7% gewinnen. Im Gegensatz dazu ist der Anteil der Calciumtransport-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums mit 22% relativ hoch.
Die spezifische Aktivität des Enzyms erhöht sich dabei von 0.1 U/mg im Rohextrakt auf 1.0 U/mg in der 30-P-Fraktion.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHTASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	187	4.525	100	35.400	100	43.900	100	6	43.000	100	450	100
AS	18o	3.85o	85	13.900	40	29.600	68	5	16.200	38	210	47
AP	20	190	4	17.300	50	7.030	16	5	7.800	18	160	36
30 S	19.5	43	1	30	1	750	1	4	135	1	6	1
30 P	4	99	2	16.500	47	1.600	4	10	2.850	7	99	22

Tabelle 1: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes unbehandelter Kontrollratten.

3.2. Präparation des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur chronisch-urämischer Ratten

Aus Skelettmuskulatur von sechs chronisch-urämischen Tieren (90% Nephrektomie) mit einem mittleren Harnstoff-N von 78.3 mg/dl wurde wie bereits angegeben der Protein-Glycogen-Komplex isoliert.

Tab. 2 zeigt die Daten während der einzelnen Isolierungsschritte. Die Proteinausbeute beträgt hier 3% bei 175 mg Gesamtprotein in 5 ml 30-P-Fraktion. Bei einer Gesamtglycogenmenge von 38.1 mg in 206 ml Rohextrakt kommt es zu einer Ausbeute von 72% in der 30-P-Fraktion.
Während sich Phosphorylase wiederum mit einer Ausbeute von 5% gewinnen läßt (der Anteil an aktiver a-Form beträgt hier 15%), kommt es zu einer Ausbeute der Glycogen-Synthetase I von 33% in der 30-P-Fraktion.
Wiederum läßt sich die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums zu 18% in der 30-P-Fraktion nachweisen. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt hier bei 0.6 U/mg .

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
HE	206	5.170	100	38.100	100	40.800	100	29	10.350	100	570	100
AS	200	4.280	83	4.800	13	27.800	68	28	1.300	12	250	44
AP	22	320	5	27.850	73	6.400	16	21	6.500	63	250	44
ZC S	18	85	2	50	1	1.600	4	29	620	6	15	3
P	5	175	3	27.650	72	1.950	5	15	3.400	33	100	18

Tabelle 2: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase und Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur chronisch urämischer Ratten (90% Nephrektomie)

3.3. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Substitution einer hochkalorischen proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser

Acht Tiere wurden wie unter 2.1.4. beschrieben scheinoperiert.
Die Tiere wurden mittels Schlundsonde 8-stündig wie folgt gefüttert:

0.5 g MLPD in Kombination mit 43 mg KAA wurden in 1 ml aqua dest. suspendiert und in einem Gesamtvolumen von 1.24 ml als Flüssignahrung in 8-stündlichem Intervall je einer Ratte gefüttert.

60 Stunden nach Operation wurden die Tiere getötet und aus der Skelettmuskulatur der Protein-Glycogen-Komplex isoliert. Der mittlere Harnstoff-N betrug 15.8 mg/dl.

Tab. 3 zeigt das Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase und Calciumtransport-ATPase während der Isolierung. Wiederum lassen sich 5% des Gesamtproteins des Rohextraktes in der 30-P-Fraktion wiedergewinnen. Allerdings kommt es unter diesen Bedingungen auch nur zu einer Glycogenausbeute von 1% in der 30-P-Fraktion bei 10 µg Gesamtglycogen in 4 ml 30 P.
Die Glycogengesamtmenge im Rohextrakt liegt bei 1.1 mg.
In der 30-P-Fraktion lassen sich 5% der Gesamtphosphorylase-Aktivität nachweisen, wobei sich der Anteil der aktiven a-Form auf 23% erhöht. Glycogen-Synthetase I findet sich in der 30-P-Fraktion mit einer Ausbeute von 18%, während die Calcium-ATPase sich mit 16% gewinnen läßt.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	296	6.510	100	1.100	100	38.400	100	48	15.000	100	670	100
AS	290	4.990	77	960	87	29.000	75	45	2.500	17	400	60
AP	21	300	5	74	7	4.750	12	36	7.600	51	180	27
30 S	18	80	1	55	5	950	3	83	170	1	6	1
30 P	4	180	3	10	1	2.010	5	23	2.650	18	110	16

Tabelle 3: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser

3.4. Gewinnung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Verfütterung einer hochkalorischen proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und zusätzlicher Gabe von Propanolol

Acht Tiere wurden wie unter 2.1.4. beschrieben scheinoperiert.
Anschließend wurden sie im 8-Stunden-Intervall wie unter 3.3. beschrieben gefüttert. Außerdem erhielten die Tiere eine subcutane Injektion von Propanolol bei jeder Fütterung entsprechend einer Dosierung von 2.5 mg/kg/24 h.

60 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere getötet. Der mittlere Harnstoff-N lag bei 16.0 mg/dl.
Während der einzelnen Isolierungsschritte kommt es zu einem Proteinverlust von 97% bei einer Gesamtproteinausbeute von 105 mg in der 30-P-Fraktion.
Bei einem Gesamtglycogen von 25.5 mg in 216 ml Rohextrakt finden sich 18% des Glycogens in der 30-P-Fraktion.
Phosphorylase läßt sich mit einer Ausbeute von 8% gewinnen, wobei der Anteil an aktiver a-Form des Enzyms 20% beträgt.

Die Glycogensynthetase I wird in der 30-P-Fraktion mit einer Ausbeute von 25% isoliert bei einer spezifischen Aktivität von 28.6 nmol $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1} .

Die Calciumtransport-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulum läßt sich mit einer Ausbeute von 13% gewinnen.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	216	3.910	100	25.500	100	19.550	100	28	12.120	100	630	100
AS	210	3.590	92	14.150	55	10.050	51	43	760	6	310	49
AP	21	145	4	4.830	19	5.100	26	7	5.360	44	220	35
30 S	17	40	1	65	1	560	3	1	380	3	6	1
30 P	4	105	3	4.550	18	1.540	8	20	3.000	25	80	13

Tabelle 4: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Glycogen-Protein-Komplexes aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und der subcutanen Injektion von Propanolol

3.5. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Verfütterung einer hochkalorischen proteinarmen Kost in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser

Zehn Tiere wurden bilateral nephrektomiert und im 8-Stunden-Intervall wie unter 3.3. beschrieben mittels Schlundsonde gefüttert.
60 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere getötet.

Tab. 5 zeigt das Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase und Calcium-ATPase während der einzelnen Reinigungsschritte.
Bei einer Proteinausbeute von 2% in der 30-P-Fraktion läßt sich unter diesen Bedingungen bei einem Gesamtglycogen von 2.3 mg in 192 ml Rohextrakt kein Glycogen in der 30-P-Fraktion nachweisen.
Phosphorylase wird mit 1% Ausbeute isoliert, wobei 41% des Enzyms in der aktiven a-Form vorliegen.
Glycogen-Synthetase wird zu 6% gewonnen bei einer spezifischen Aktivität von 4.8 nmol x min^{-1} x mg^{-1} .
Die Calciumtransport-ATPase findet sich in der 30-P-Fraktion mit einer Ausbeute von 14%.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	192	4.950	100	2.300	100	17.800	100	50	6.420	100	760	100
AS	175	4.600	93	1.750	76	13.800	78	47	2.300	36	440	58
AP	21	120	3	-	-	450	3	54	1.330	21	265	35
30 S	18	35	1	-	-	150	1	39	870	14	10	1
30 P	4	80	2	-	-	230	1	41	385	6	110	14

Tabelle 5: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser

3.6. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer proteinarmen hochkalorischen Diät mit Zusatz des Ketosäurengemisches nach Walser und einer gleichzeitigen Gabe von Propanolol

Zehn Tiere wurden bilateral nephrektomiert und wie unter 3.4. beschrieben behandelt. 60 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere getötet.

Tab. 6 zeigt die einzelnen Isolierungsdaten.
Bei einer Proteinausbeute von 2% in der 30-P-Fraktion (insgesamt 90 mg Protein) kommt es parallel dazu zu einer Glycogenausbeute von 1% (insgesamt 10 µg Glycogen in der 30-P-Fraktion). Phosphorylase läßt sich mit 3% anreichern, wobei der Anteil an aktiver a-Form des Enzyms bei 76% liegt. Glycogen-Synthetase I läßt sich mit 4% anreichern, wobei die spezifische Aktivität des Enzyms 2.8 nmol x min^{-1} x mg^{-1} beträgt.

Parallel dazu zeigt Tab. 7 das Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase und Calcium-ATPase unter den gleichen diätetischen und medikamentösen Bedingungen bei ureter-ligierten Ratten. Zehn Tiere wurden beidseits ureterligiert und wie unter 3.4. beschrieben behandelt. 60 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere getötet. Der mittlere Harnstoff-N betrug 362 mg/dl (60 Stunden nach Binephrektomie 360 mg/dl). Bei einer Proteinausbeute von 1% bei 60 mg Totalprotein und einer Glycogenausbeute von 1% bei einem Gesamtglycogen von 7 µg in der 30-P-Fraktion kommt es zu einer Ausbeute der Phosphorylase

von 3% (aktive a-Form 78%), der Synthetase I von 8% (spezifische Aktivität 9.2 nmol x min^{-1} x mg^{-1}) und der Calcium -ATPase von 18%.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	321	6.600	100	1.925	100	7.300	100	45	6.500	100	700	100
AS	316	6.05[illegible]	[illegible]1	1.[illegible]25	[illegible]5	4.200	57	43	1.210	19	420	60
AP	22	150	2	2[illegible]	1	[illegible]40	7	58	1.500	23	280	40
30 S	18	55	1	10	1	170	2	27	1.150	18	25	4
30 P	4.8	90	2	10	1	230	3	76	250	4	150	21

Tabelle 6: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und der subcutanen Injektion von Propanolol

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	246	6.100	100	1.650	100	11.300	100	68	6.700	100	610	100
AS	242	5.560	91	1.450	89	5.600	50	80	4.450	66	330	54
AP	21	120	2	20	1	580	5	65	1.550	23	220	36
30 S	17	50	1	6	1	100	1	70	790	12	6	1
30 P	4.3	60	1	7	1	310	3	78	550	8	110	18

Tabelle 7: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur ureterliegierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und der subcutanen Injektion von Propanolol

3.7. Präparation eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer gemischten proteinarmen Kost, Ketosäuren nach Walser, Propanolol und hoher Serindosen

10 Tiere wurden bilateral nephrektomiert. Im 8-Stunden-Intervall wurden die Tiere behandelt wie unter 3.6. beschrieben. Außerdem erhielten diese Tiere zusätzlich Serin in hoher Dosierung (100 mg/Fütterung/Ratte entsprechend 1.5 g/kg/24 h).
60 Stunden nach Binephrektomie wurden die Tiere getötet. Der mittlere Harnstoff-N betrug 300 mg/dl.

Die während der Isolierung gewonnenen Daten sind in Tabelle 8 wiedergegeben.
Bei einer Proteinausbeute von 3% bei insgesamt 160 mg Protein in 4 ml 30-P-Fraktion ließen sich 21.5 mg Glycogen in der 30-P-Fraktion mit einer Ausbeute von 83% gewinnen. Parallel dazu kam es zu einer Phosphorylaseausbeute von 20% bei einem Anteil von 48% Phosphorylase a. Glycogensynthetase wurde mit 23% Ausbeute isoliert, die spezifische Aktivität der I-Form betrug dabei 20.6 nmol $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1} .
Die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums wurde ebenfalls mit 20% Ausbeute in der 30-P-Fraktion nachgewiesen.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	233	4.660	100	26.300	100	10.250	100	64	14.000	100	890	100
AS	226	4.300	92	3.100	12	5.580	54	77	3.050	22	340	38
AP	21	330	7	22.200	84	2.450	24	54	6.050	43	330	37
30 S	19	70	2	100	1	170	2	42	300	2	11	1
30 P	4	160	3	21.500	83	2.100	20	48	3.300	23	180	20

Tabelle 8: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und hoher Serindosen, sowie der subcutanen Injektion von Propanolol

3.8. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution hoher Dosen an Ketosäuren in Kombination mit gemischter proteinarmer hochkalorischer Kost und Gabe von Propanolol

10 Tiere wurden bilateral nephrektomiert. Alle 8 Stunden wurde den Tieren wie unter 3.4. beschrieben, Propanolol injiziert. Außerdem erhielten die Tiere mittels Sonde wie in allen vorausgegangenen Versuchen eine gemischte, proteinarme, hochkalorische Kost.
Zusätzlich wurde diesen 10 Ratten in hoher Dosierung 5 Ketosäuren und 4 essentielle Aminosäuren nach Walser gefüttert (142 mg/Fütterung/Ratte entsprechend 2.1 g/kg/24 h).
60 Stunden nach Binephrektomie wurden die Tiere getötet.
Der mittlere Harnstoff-N betrug 355 mg/dl.
Die während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes unter diesen Bedingungen gewonnenen Daten sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Bei einer Proteinausbeute von 3% und 110 mg Gesamtprotein in 5 ml 30-P-Fraktion kommt es zu einer Glycogenausbeute von 51% bei 1.55 mg Gesamtglycogen.
In 232 ml Rohextrakt lassen sich 3.05 mg Glycogen nachweisen. Phosphorylase befindet sich zu 8% in der 30-P-Fraktion bei 14% aktiver a-Form, Glycogensynthetase I zu 22% bei einer spezifischen Aktivität von 21.8 nmol x min^{-1} x mg^{-1} .
Die Calcium-ATPase läßt sich zu 14% in der 30-P-Fraktion wiederfinden.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	232	3.970	100	3.050	100	18.700	100	13	10.700	100	635	100
AS	227	3.790	95	1.250	41	11.400	61	7	2.300	21	300	47
AP	22	190	5	1.680	55	2.400	13	32	7.000	65	190	30
30 S	18	55	1	110	4	650	4	8	900	8	6	1
30 P	5	110	3	1.545	51	1.450	8	14	2.400	22	90	14

Tabelle 9: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser in hoher Dosierung und der subcutanen Injektion von Propanolol

3.9. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer gemischten proteinarmen Diät in Kombination mit Propanolol und gleichzeitiger isolierter hoher Serindosierung

10 Tiere wurden bilateral nephrektomiert und 8-stündlich behandelt wie unter 3.7. beschrieben unter Weglassung der Ketosäuren nach Walser.
60 Stunden nach Operation wurden die Tiere getötet.
Der mittlere Harnstoff-N betrug 365 mg/dl.

Tabelle 10 gibt die während der Isolierung gewonnenen Daten wieder.
Bei einer Proteinausbeute von 2% und 80 mg Gesamtprotein in der 30-P-Fraktion lassen sich insgesamt 40 µg Glycogen bei einer Ausbeute von 2% nachweisen.
Die Ausbeute an Phosphorylase beträgt 4% (aktiver Anteil 3%), an Glycogensynthetase 11% (spezifische Aktivität der I-Form 27.5 nmol x min^{-1} x mg^{-1}).
Die Ausbeute an Calcium-ATPase beträgt 21%.

FRACTION	VOLUME	PROTEIN		GLYCOGEN		PHOSPHORYLASE			SYNTHETASE		ATPase	
	ml	mg	%	ug	%	U	%	% a	U	%	U	%
CE	255	5.050	100	2.250	100	30.300	100	3	20.200	100	580	100
AS	249	4.200	83	2.100	93	14.500	48	3	3.000	15	250	43
AP	22	170	3	100	5	5.800	19	4	9.800	48	205	35
30 S	17	60	1	20	1	970	3	4	2.800	14	5	1
30 P	5	80	2	40	2	1.200	4	3	2.200	11	120	21

Tabelle 10: Verhalten von Protein, Glycogen, Phosphorylase, Glycogen-Synthetase, Calciumtransport-ATPase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit Serin in hoher Dosierung und der subcutanen Injektion von Propanolol

3.10. Bezieht man die Gesamtglycogenmenge in der 30-P-Fraktion auf die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums als Maßzahl (relativ konstante Anreicherung unter den 10 verschiedenen Versuchsbedingungen) so ergeben sich folgende Aspekte (Abb. 1):
Unter diesen Bedingungen findet sich die höchste Glycogenkonzentration im Skelettmuskel chronisch urämischer Ratten mit 275 ug Glycogen, während der Vergleichswert für unbehandelte Kontrollen bei 170 ug liegt. Deutlich meßbare Glycogenkonzentrationen finden sich in dieser Darstellung von den Akuttieren lediglich bei Ratten 60 Stunden nach Binephrektomie, die mit gemischter, proteinarmer, hochkalorischer Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser, Propanolol und gleichzeitiger hoher Serindosierung (140 ug Glycogen) behandelt wurden.

Abb. 1

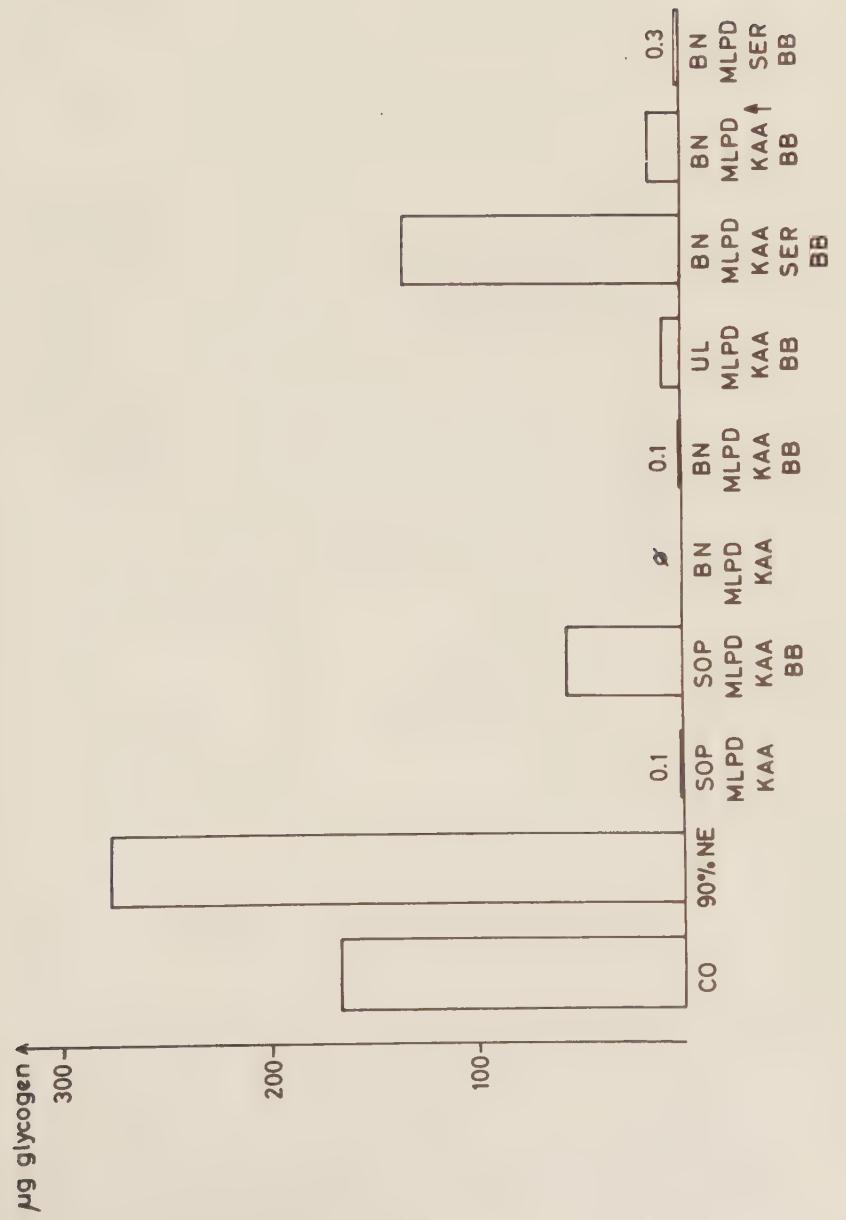
µg glycogen
300
200
100
CO
90%.NE
0.1
SOP MLPD KAA
SOP MLPD KAA BB
BN MLPD KAA
ø
0.1
BN MLPD KAA BB
UL MLPD KAA BB
BN MLPD KAA SER BB
BN MLPD KAA KAA BB
0.3
BN MLPD SER BB

Abbildung 1:

Die unter 10 verschiedenen Bedingungen isolierten 30-P-Fraktionen (siehe Ergebnisteil) wurden mit der Calciumtransport-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums in Beziehung gesetzt.
Dabei wurde die Calciumtransport-ATPase wegen der relativen Konstanz in der Ausbeute während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes als Maßzahl verwendet und die Glycogenkonzentration/Calcium-ATPase als Quotient aufgetragen.

3.11. Tabelle 11 gibt die Beziehung zwischen der spezifischen Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase zum Protein-Glycogen-Komplex bei akuter Urämie und nach Scheinoperation wieder.

Während unbehandelte Kontrollen eine spezifische Aktivität des Enzyms von 10.6 µmol x min^{-1} x mg^{-1} aufweisen, kommt es zu einer Glycogenausbeute in der 30-P-Fraktion von 166.7 µg/mg.
Die niedrigste spezifische Aktivität des Enzyms mit 0.39 µmol x min^{-1} x mg^{-1} findet sich 60 Stunden nach Binephrektomie unter Gabe von gemischter, proteinarmer, hochkalorischer Kost in Kombination der Ketosäuren nach Walser.
Parallel hierzu läßt sich kein Glycogen in der 30-P-Fraktion bestimmen. Umgekehrt kommt es nach zusätzlicher Gabe von Propanolol und hoher Dosen Serin zueinem 10-fachen Anstieg der spezifischen Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase (4.03 µmol x min^{-1} x mg^{-1}) und gleichzeitig zu einer Glycogenausbeute von 134.4 µg/mg Protein.

RELATIONSHIP BETWEEN PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE ACTIVITY AND GLYCOGEN CONCENTRATION IN THE PROTEIN-GLYCOGEN COMPLEX

	nMOL PHOSPHAT x MIN^{-1} x MG $PROTEIN^{-1}$	µG GLYCOGEN/MG PROTEIN
UNTREATED CONTROLS	10,55	166,7
90 % NEPHRECTOMY	3,60	158,0
60 H AFTER SOP, MLPD, KAA	1,07	0,06
60 H AFTER SOP, MLPD, KAA, BB	2,19	43,3
60 H AFTER BN, MLPD, KAA	0,39	*
60 H AFTER BN, MLPD, KAA, BB	0,75	0,11
60 H AFTER UL, MLPD, KAA, BB	1,05	0,12
60 H AFTER BN, MLPD, KAA, BB, SER	4,03	134,4
60 H AFTER BN, MLPD, KAA↑,BB	2,78	14,1
60 H AFTER BN, MLPD, SER, BB	1,34	0,5

* CONCENTRATION TOO LOW TO BE DETECTED

Tabelle 11:

Glycogen wurde in jeder der 10 30-P-Fraktionen nach Montgomery wie im Methodenteil beschrieben analysiert.
Die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wurde nach Hurd wie angegeben ermittelt. Als Substrat für die Phosphatasemessung diente ^{32}P-markierte Phosphorylase a.

3.12. Abbildung 2 zeigt die Blitzaktivierung der Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex.
Wird zum Zeitpunkt 0 zum Protein-Glycogen-Komplex unbehandelter Kontrollratten ATP zugegeben, so kommt es zu einer geringen Phosphorylase b- zu a-Umwandlung (Spuren von Calcium im Inkubationsansatz!).
Nach etwa 1 1/2 Minuten lassen sich im Protein-Glycogen-Komplex unbehandelter Kontrollratten ca. 8% Phosphorylase in der aktiven a-Form nachweisen.
Nach Zugabe von Calcium und Magnesium kommt es zu einer Blitzaktivierung des Enzyms. Dabei werden ca. 60% des Enzyms in die aktive a-Form umgewandelt.
Anschließend kommt es durch Aktivierung der Phosphorylase-Phosphatase zu einer Dephosphorylierung der Phosphorylase-a.
Wiederholte Zugaben von ATP führen zu einer abermaligen Blitzaktivierung der Phosphorylase. Wird nun zum Protein-Glycogen-Komplex akut urämischer Ratten, die mit gemischter proteinarmer Diät, dem Ketosäurengemisch nach Walser, Propanolol und hohen Dosen Serin behandelt wurden, ATP zugegeben, so kommt es ebenfalls durch Spuren von Calcium im System zu einer schwachen Blitzaktivierung.
Nach ca. 1 1/2 Minuten zeigt sich, daß etwa 30% der Phosphorylase unter diesen Bedingungen in der aktiven a-Form vorliegen. Die Zugabe von Calcium und Magnesium führt zu einer Blitzaktivierung der Phosphorylase mit einer b- zu a-Umwandlung von ca. 68%. Wiederholte ATP-Gaben führen zu einer wiederholten Blitzaktivierung der Phosphorylase. Betrachtet man dagegen die Phosphorylase im Protein-Glycogen-Komplex von Ratten, die lediglich mit gemischter, proteinarmer Basisdiät in Kombination

von Ketosäuren nach Walser behandelt wurden, so zeigt sich, daß bereits nach ATP-Zugabe 70% des Enzyms in der aktiven a-Form vorliegen.
Eine weitere Stimulierung durch Calcium und Magnesium läßt sich nicht mehr erzielen.

FLASH ACTIVATION OF PHOSPHORYLASE IN A GLYCOGEN PROTEIN COMPLEX ISOLATED FROM RAT SKELETAL MUSCLE

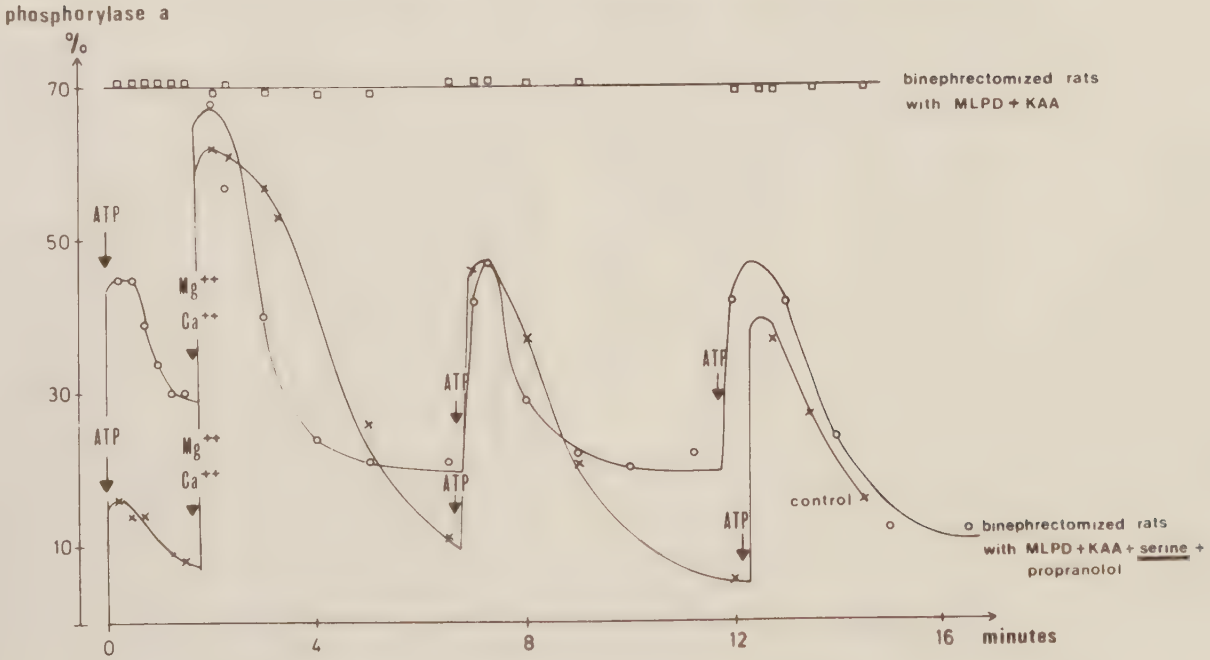

Abbildung 2:

Die Blitzaktivierung der Phosphorylase in dem Protein-Glycogen-Komplex erfolgte nach Heilmeyer et al. (25) wie im Methodenteil beschrieben.
460 µl Protein-Glycogen-Komplex wurden mit 5 mM $MgCl_2$ (Endkonzentration), 1 mM $CaCl_2$ und 1 mM ATP inkubiert. In Zeitabständen zwischen 15 Sekunden und einer Minute wurden Proben zu 20 µl in 2 ml Verdünnungspuffer (50 mM Na-Glycero-Phosphat, 40mM Mercaptoäthanol, 1 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mM EDTA, pH 6.8) abgestoppt. Die gebildete Phosphorylase a wurde nach Hedrick und Fischer (20) wie beschrieben ermittelt. Untersucht wurden 30-P-Fraktionen aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten, binephrektomierter Ratten (60 h) unter Substitution einer proteinarmen, hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser allein und mit zusätzlicher Gabe hoher Serindosen sowie einer subcutanen Injektion von Propanolol.

3.13. Abbildung 3 zeigt den Effekt verschiedener ATP-Konzentrationen auf die b- zu a-Konvertierung der Phosphorylase.
Bei einer ATP-Konzentration von 1 mmol kommt es zu einem Anstieg von 60% a-Form, Nach 5 Minuten sind die Ausgangswerte (ca. 8% a-Form) wieder erreicht.
Die gleiche Aktivierungskurve ist erhältlich bei einer ATP-Konzentration von 2.0 mmol.
Bei einer ATP-Konzentration von 0.5 mmol kommt es nur zu einer 30%igen Konvertierung der Phosphorylase-b zu -a , wobei nach 2 Minuten der Ausgangswert wieder erreicht ist.
Wiederum erweist sich Phosphorylase in dem Protein-Glycogen-Komplex akut urämischer Ratten mit Substitution einer hochkalorischen proteinarmen Diät in kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser als nicht ATP-stimulierbar.

Abb. 3

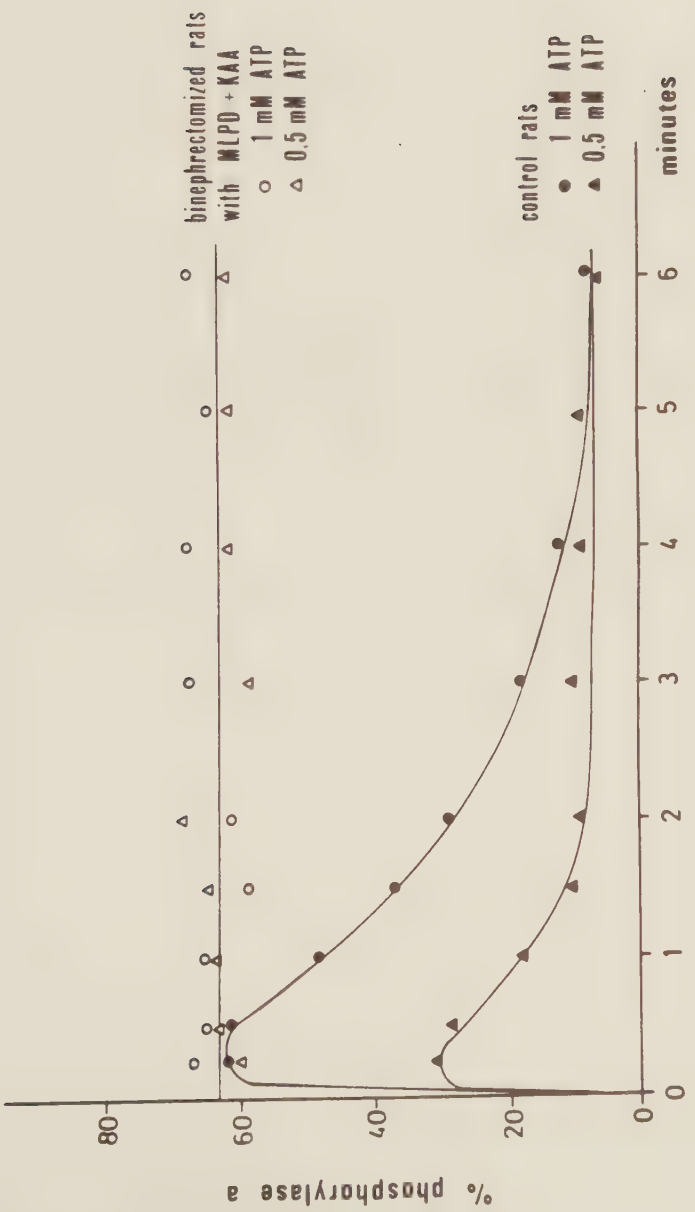
% phosphorylase a
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
minutes
binephrectomized rats
with MLPD + KAA
○ 1 mM ATP
△ 0.5 mM ATP
control rats
● 1 mM ATP
▲ 0.5 mM ATP

Abbildung 3:

Einfluß verschiedener ATP-Konzentrationen auf die Phosphorylase b- zu a-Umwandlung in dem Protein-Glycogen-Komplex unbehandelter Kontrollratten und aus Skelettmuskulatur von Ratten 60 Stunden nach Binephrektomie unter Substitution einer proteinarmen hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser.
460 µl Protein-Glycogen-Komplex wurden in Gegenwart von 0.5 und 1 mM ATP (Endkonzentrationen) zusammen mit 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM $CaCl_2$ inkubiert.

3.14. Abbildung 4 zeigt den Unterschied der Blitzaktivierung von Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex, isoliert aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten im Vergleich zu einem Protein-Glycogen-Komplex, isoliert aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kaninchen.
Man erkennt, daß nach Zugabe von ATP, Calcium und Magnesium die Blitzaktivierung und Inaktivierung der Phosphorylase im Protein-Glycogen-Komplex aus Kaninchenmuskulatur ca. 4-fach schneller verläuft.

DIFFERENCES IN FLASH ACTIVATION OF PHOSPHORYLASE IN A PROTEIN GLYCOGEN COMPLEX ISOLATED FROM RAT OR RABBIT SKELETAL MUSCLE

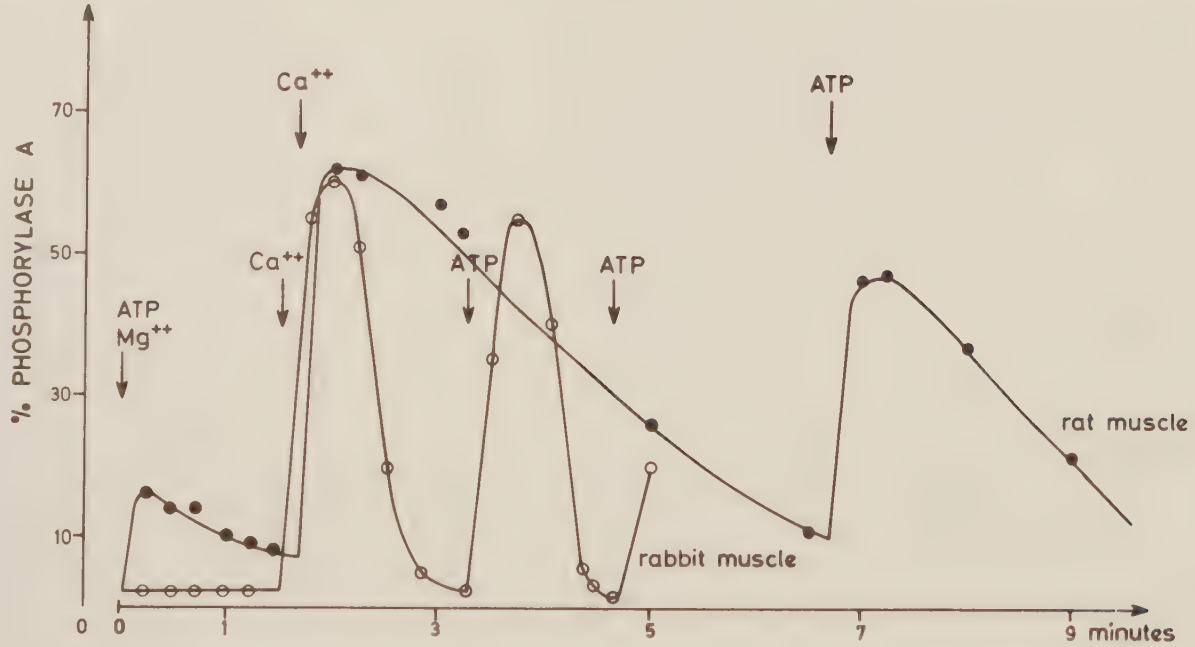

Abbildung 4:

Vergleich zwischen der Blitzaktivierung von Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex aus Rattenmuskulatur mit einem Protein-Glycogen-Komplex isoliert aus Kaninchenmuskulatur nach Heilmeyer et al. (25).
Die Versuchsbedingungen sind im Methodenteil sowie in der Legende zur Abbildung 2 ausführlich wiedergegeben.

3.15. Abbildung 5 zeigt die Identifizierung der Komponenten des Protein-Glycogen-Komplexes mittels SDS-Gelelektrophorese.
Man erkennt die schwere Kette des Myosins, Debranching-Enzyme, die Polypeptidketten α , β und γ von Phosphorylase-Kinase, die Calciumtransport-ATPase, Phosphorylase, Glycogensynthetase, Calsequestrin, Aktin und Phosphorylase-Phosphatase.
Ein in seiner Proteinzusammensetzung nahezu identischer Protein-Glycogen-Komplex kann aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten unter Substitution einer gemischten, proteinarmen, hochkalorischen Diät Unter Zusatz von Ketosäuren nach Walser, hohen Serindosen und der Gabe von Propanolol erzielt werden (rechte Hälfte der Abbildung).
Im Vergleich zwischen den Proteinkomponenten des Protein-Glycogen-Komplexes aus Muskulatur unbehandelter Kontrollratten und den Proteinkomponenten des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter Ratten unter Substitution mit einer Gemischten proteinarmen Diät, den Ketosäuren nach Walser und der Gabe von Propanolol zeigt sich, daß es unter Urämiebedingungen zu einer deutlichen Abnahme der höhermolekularen Komponenten kommt:
Verminderung von Debranching-Enzyme, der Polypeptidketten α und β von Phosphorylase-Kinase, dagegen Zunahme der niedermolekularen Fraktionen:
Calsequestrin und γ -Kette von Phosphorylase-Kinase (Abbildung 6).

Abb. 5

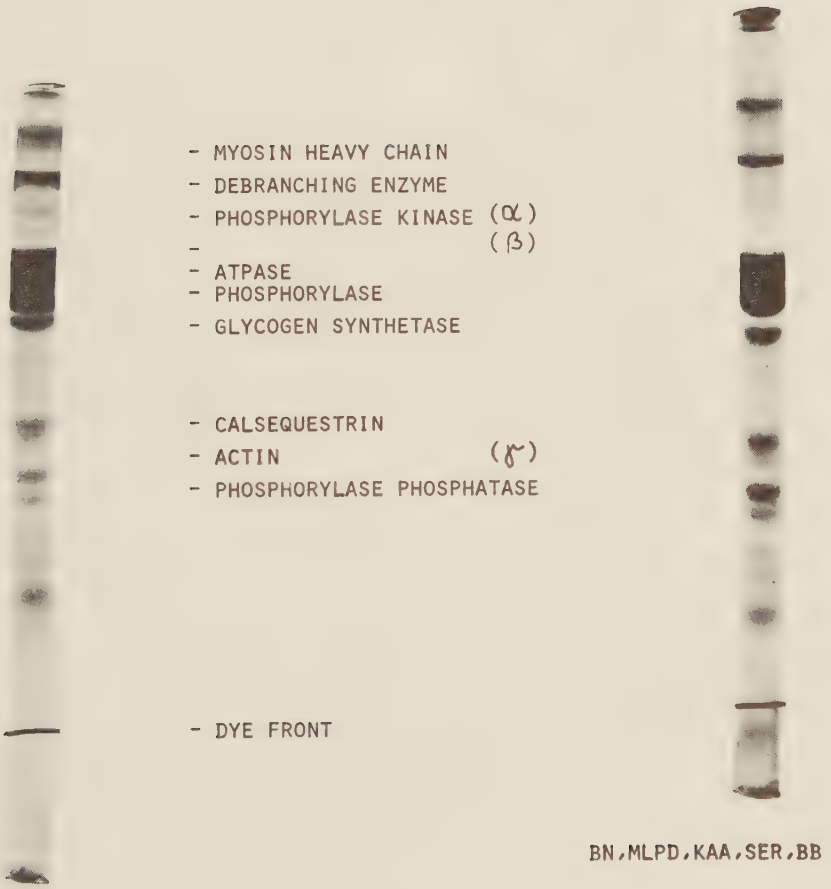
- MYOSIN HEAVY CHAIN
- DEBRANCHING ENZYME
- PHOSPHORYLASE KINASE (α)
- (β)
- ATPASE
- PHOSPHORYLASE
- GLYCOGEN SYNTHETASE
- CALSEQUESTRIN
- ACTIN (γ)
- PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE
- DYE FRONT
CO
BN,MLPD,KAA,SER,BB

Abbildung 5:

SDS-Gelelektrophoretische Auftrennung der Komponenten des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollratten im Vergleich zu binephrektomierten Tieren unter Substitution einer proteinarmen Diät in Kombination mit Ketosäuren nach Walser, Serin in hoher Dosierung und Propanolol. 40 µg Protein wurden jeweils wie im Methodenteil beschrieben nach Weber und Osborn (26) aufgetrennt.

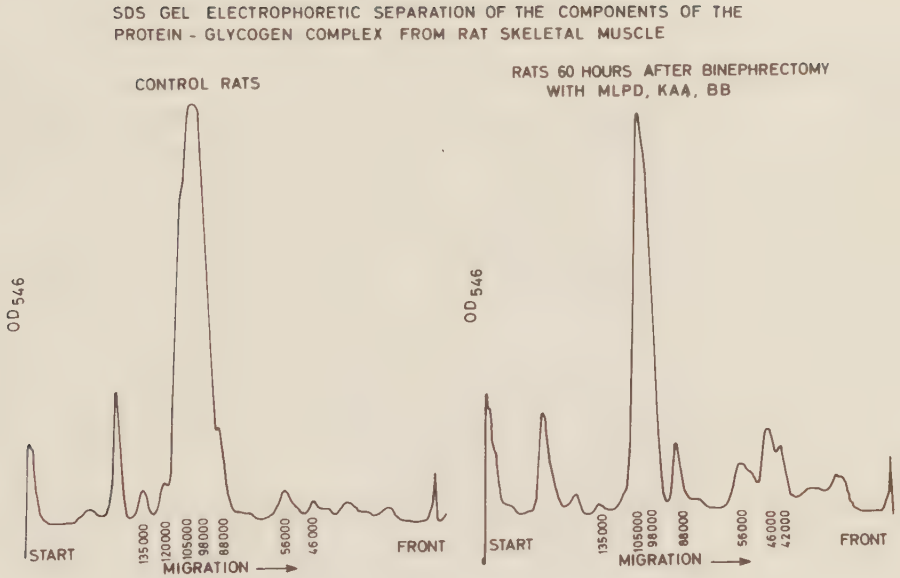

Abbildung 6:

Densitometrische Auswertung nach Auftrennung der Komponenten des Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskutatur unbehandelter Kontrollratten und binephrektomierter Tiere unter Substitution einer proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und Propanolol.
Je 40 ug Protein wurden mittels SDS-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn analysiert (26).

4. DISKUSSION

Nach Untersuchungen von Meyer et al. (16) ist der Protein-Glycogen-Komplex eine spezifische funktionelle Zelleinheit und kein Isolierungsartefakt. Diese intrazelluläre Organelle wurde aus Kaninchenmuskulatur isoliert und charakterisiert (16,25,28).
Uns gelang erstmals die Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur der Ratte. Im Gegensatz zu den Daten am Kaninchenmuskel (16) korrelieren die Ausbeuten an Phosphorylase während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes prozentual nicht mit der Glycogenkonzentration. Offensichtlich zeigt Phosphorylase aus Rattenmuskulatur eine lockerere Bindung an Glycogen als Phosphorylase aus Kaninchenmuskel.
Allerdings kommt es während der einzelnen Isolierungsschritte zu einer ca. 2fach höheren Anreicherung der Phosphorylase a im Gegensatz zur Phosphorylase b.
Unseres Erachtens bieten sich hierfür zwei Möglichkeiten der Interpretation an: Einmal könnte die phosphorylierte Form der Phosphorylase (Phosphorylase a) besser an Glycogen gebunden werden als die nicht phosphorylierte b-Form. Zum anderen könnte während der Isolierung die AMP-Aktivierung der Phosphorylase b verloren gehen.

Die gleiche Beziehung zum Glycogen wie für Phosphorylase von Meyer et al. (16) gezeigt, ist durch Hickenbottom (29) auch für die Glycogensynthetase nachgewiesen. Eine solche Korrelation ist im Rattenmuskel unter Kontrollbedingungen jedoch wiederum nicht gegeben.
Unter den Bedingungen einer akuten Urämie findet sich indes eine solche Korrelation nach Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes aus Skelettmuskulatur binephrektomierter

Ratten, die neben einer gemischten, hochkalorischen proteinarmen Diät, dem Ketosäurengemisch nach Walser und Propanolol auch hohe Dosen an Serin erhielten.

Im Gegensatz zu Phosphorylase-Kinase (30) ist im Kaninchenmuskel das antagonistische Enzym Phosphorylase-Phosphatase eindeutig mit dem Protein-Glycogen-Komplex assoziiert (16).

Unsere Daten zeigen eine strenge Korrelation zwischen der Glycogen-Konzentration in dem Protein-Glycogen-Komplex mit der spezifischen Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase.

So beträgt beispielsweise die Glycogen-Konzentration in dem Protein-Glycogen-Komplex unbehandelter Kontrollratten 166.7/mg Protein bei einer spezifischen Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase von
10.6 µmol x min^{-1} x mg^{-1}, während bei einer Glycogen-Konzentration von 0.12 µg/mg Protein in einem Protein-Glycogen-Komplex 60 Stunden nach Binephrektomie unter hochkalorischer Diät, der Applikation von Ketosäuren nach Walser und der Gabe von Propanolol die spezifische Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase
0.39 µmol x min^{-1} x mg^{-1} beträgt.

Nach Untersuchungen von Hörl und Heilmeyer (31) ist die Phosphorylase-Phosphatase außerdem mit den Membranfraktionen des sarkoplasmatischen Reticulums assoziiert und involviert in die Regulation der Calciumtransport-ATPase. Da zusammen mit dem Protein-Glycogen-Komplex Fragmente des sarkoplasmatischen Reticulums isoliert werden (16), muß in die Diskussion um die Regulation der Phosphorylase a zu b-Umwandlung auch die Regulation der Calciumtransport-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums mit einbezogen werden.

Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wird darüber hinaus durch einen phosphorylierbaren und dephosphorylierbaren Inhibitor I reguliert (32).
Da wir nach Applikation hoher Serindosen in Kombination mit einer hochkalorischen Diät, dem Ketosäurengemisch nach Walser und der Gabe von Propanolol einen intakten Protein-Glycogen-Komplex mit relativ hoher spezifischer Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase isolieren, bleibt die Frage offen, inwieweit die Applikation von Serin direkt Einfluß auf den Phosphorylase-Phosphatase-Inhibitor nimmt.

Phosphorylase läßt sich in dem Protein-Glycogen-Komplex durch Calciumionen in Gegenwart von ATP und Magnesium schnell aktivieren, sehr ähnlich den schnellen Änderungen in der Aktivität, die sich im Muskel während des Kontraktions-Relaxations-Zyklus beobachten lassen (25).
Die Phase der Blitzaktivierung und Inaktivierung der Phosphorylase in einem Protein-Glycogen-Komplex resultiert im Kaninchenmuskel innerhalb von 1 1/2 Minuten, während dieser Prozeß im Rattenmuskel ca. 6 Minuten dauert.
Wir finden in dem Protein-Glycogen-Komplex der Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrolltiere nach Zugabe von ATP und Magnesium einen aktiven Anteil an Phosphorylase a von ca. 8% nach vorausgegangener geringer Aktivierung durch Spuren von Calcium in unserem Medium.
Nach Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes bei akuter Urämie unter Fütterung einer hochkalorischen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und einer zusätzlichen Applikation von Propanolol finden wir indes eine maximale Stimulierung der Phosphorylase mit einem Anteil von 70% aktiver a-Form.
Eine weitere Stimulierung dieser Phosphorylase durch Zugabe von Calcium, Magnesium und ATP ist nicht mehr möglich. Offensichtlich ist unter diesen Bedingungen die Phosphorylase-Phosphatase komplett inaktiviert.

Die zusätzliche Applikation hoher Dosen an Serin dagegen erniedrigt den Anteil der Phosphorylase a auf 30% und erlaubt darüber hinaus eine typische Blitzaktivierung der Phosphorylase unter diesen Bedingungen.

Die Phosphorylase b zu a-Umwandlung in einem Protein-Glycogen-Komplex wird inhibiert durch Glukose 6-Phosphat (27). Diskutiert werden als mögliche Mechanismen eine Inhibierung der Phosphorylase-Kinase oder aber eine Aktivierung der Phosphorylase-Phosphatase.
Kinetische Analysen der Phosphorylase-Aktivierung in intaktem Muskel während des Kontraktions-Relaxations-Zyklus sprechen für eine Aktivierung der Phosphorylase durch Phosphorylase-Kinase-Aktivierung, nicht durch eine Inhibierung der Phosphorylase-Phosphatase (33).
Phosphorylase-Kinase läßt sich unter hormoneller Kontrolle von Adrenalin über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase stimulieren (34).
Die Phosphorylase-Aktivierung während der Muskelkontraktion jedoch resultiert nicht aus einer Hormon-vermittelten Aktivierung von Phosphorylase-Kinase (35,36).
Eine Katecholamin-induzierte Stimulierung der Glycogenolyse als alleinige Ursache für die Erhöhung der Phosphorylase a-Konzentration in dem Protein-Glycogen-Komplex ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sich nach Applikation eines ß-Rezeptorenblockers (8) keine Effekte auf die Phosphorylase b zu a-Umwandlung nachweisen lassen.
Die enge Korrelation zwischen Glycogen-Konzentration und Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität macht dagegen eine Regulation der Phosphorylase-Aktivierung bzw. -inaktivierung über einen Regelmechanismus via Phosphorylase-Phosphatase wahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu läßt sich am chronisch urämischen Muskel zeigen, daß die Aktivierung der Glycogenolyse synchron mit einem Anstieg der cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase-Aktivität einhergeht.
Hier führt auch die Applikation von Propanolol zu einer Normalisierung des Glycogen-Turnover (11).
In Übereinstimmung mit diesen Daten läßt sich aus Skelettmuskulatur chronisch urämischer Ratten ein intakter Protein-Glycogen-Komplex isolieren mit einer Glycogen-Konzentration von 158.0 µg/mg Protein. Auch unter diesen Bedingungen läßt sich ein relativ hoher Anteil an Phosphorylase a (2.3 U/mg bei 11900 Gesamteinheiten) nachweisen, während die Werte im Rohextrakt unbehandelter Kontrollen eindeutig niedriger liegen (0.53 U/mg bei 2400 Gesamteinheiten) Die Steigerung der Ausbeute an aktiver Glycogensynthetase I (33%) in dem Protein-Glycogen-Komplex unter chronisch urämischen Bedingungen im Vergleich zu 7% im Protein-Glycogen-Komplex unbehandelter Kontrollen läßt auch unter diesen Bedingungen einen erhöhten Glycogen-Turnover im Skelettmuskel chronisch urämischer Ratten vermuten (11).

Nach jüngsten Daten von Heilmeyer und Mitarbeiter (37) lassen sich 4 Zustände von Phosphorylase-Kinase und Phosphorylase-Phosphatase differenzieren, die die Phosphorylase b zu a-Umwandlung kontrollieren.
Im ruhenden Muskel befindet sich Phosphorylase vorwiegend in der inaktiven b-Form, lediglich 5% lassen sich in der aktiven a-Form des Enzyms nachweisen. Die Aktivität der Phosphorylase-Kinase unter diesen Bedingungen (Calciumionen-Konzentration zwischen 0.4 nM und 0.1 µm) wird als a_0 bezeichnet.
Phosphorylase-Phosphatase ist unter diesen Bedingungen aktiv, der Phosphorylase-Phosphatase-Inhibitor I nicht phosphoryliert.

Die Applikation von Epinephrin führt zu einem Anstieg der Phosphorylase a auf 50% innerhalb von 24 Sekunden über eine Inaktivierung der Phosphorylase-Phosphatase durch Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors I (32, 38, 39).
Im kontrahierenden Muskel wird die Aktivität der Phosphorylase-Kinase, halbmaximal stimuliert bei einer Calciumionen-Konzentration von 70 µM, durch a_1 ausgedrückt. Phosphorylase-Phosphatase wird unter diesen Bedingungen sowohl durch Calcium-, als auch durch die Interaktion mit dem sarkoplasmatischen Reticulum inhibiert (25, 40, 31).
Die Aktivität a_2 der Phosphorylase-Kinase bei Calciumionenkonzentrationen von 200 µM in Gegenwart von Epinephrin und eine Interaktion mit sarkoplasmatischem Reticulum erlaubt eine b zu a-Konvertierung von 95% innerhalb 1.5 Sekunden bei phosphoryliertem Phosphatase-Inhibitor 1 (37).

Die Stimulierung der Phosphorylase b zu a-Umwandlung unter akut urämischen Bedingungen könnte also nach diesen Untersuchungen 3-fach bedingt sein durch

1. eine Calcium-bedingte Stimulierung der Phosphorylase-Kinase mit synchroner Inaktivierung der Phosphorylase-Phosphatase.
2. eine Inaktivierung der Phosphorylase-Phosphatase durch Interaktion mit dem sarkoplasmatischen Reticulum.
3. eine Inaktivierung der Phosphorylase-Phosphatase durch Katecholamin-bedingte Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors 1.

Bei der SDS-Gelelektrophoretischen Auftrennung der Komponenten des Protein-Glycogen-Komplexes finden wir in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Meyer et al. (16) die Enzyme, die in die Regulation des Glycogenstoffwechsels involviert sind. Ferner in Übereinstimmung mit Caudwell et al. (41) Anteile des sarkoplasmatischen Reti-

culums sowie kontraktile Proteine.
Unter akut urämischen Bedingungen kommt es nun zu einer deutlichen Reduzierung der glycogenolytischen Enzyme sowie der Glycogen-Synthetase am Proteinanteil des Protein-Glycogen-Komplexes. Der Abbau von Glycogen im Skelettmuskel akut urämischer Ratten führt zu einer Freisetzung der Enzyme im Protein-Glycogen-Komplex.

Auffällig ist unter den verschiedenen Bedingungen der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes die relative Konstanz der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums mit einem prozentualen Anteil von 16 bis 22% der Ausbeute. Damit bietet sich die Calcium-ATPase als Maßzahl für andere Parameter während der Isolierung des Protein-Glycogen-Komplexes an.

Im Gegensatz zu Untersuchungen am akut urämischen Modell läßt sich 60 Stunden nach Scheinoperation ein intakter Protein-Glycogen-Komplex isolieren (43.3 µg Glycogen/mg Protein) unter Substitution einer hochkalorischen proteinarmen Diät mit Zusatz von Ketosäuren nach Walser und Applikation von Propanolol.
Durch diese Untersuchung wird deutlich, daß die urämiebedingte Glycogenolyse sich spezifisch von einer rein streßbedingten Stimulierung des Glycogenabbaus unterscheidet.

Dabei scheint - wie Untersuchungen von Hörl und Heidland an Phosphorylase-Kinase-defizienten Mäusen zeigen konnten (normaler Glycogengehalt bei nüchternen Mäusen bis 24 Stunden nach Binephrektomie !) dem Schlüsselenzym des Glycogenstoffwechsels Phosphorylase-Kinase auch eine Schlüsselrolle für die Regulation des Glycogenstoffwechsels unter Urämiebedingungen zuzukommen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus Skelettmuskulatur akut und chronisch urämischer Ratten, scheinoperierter Tiere sowie unbehandelter Kontrollen wurde versucht, ein Protein-Glycogen-Komplex als intakte intrazelluläre Organelle zu isolieren.

Folgende Ergebnisse konnten erarbeitet werden:

1. Aus Skelettmuskulatur unbehandelter Kontrollen läßt sich ein Protein-Glycogen-Komplex isolieren in einer Glycogen-Konzentration von 166.7 µg/mg Protein bei einer Glycogenausbeute von 47%.
   Im Gegensatz zu Untersuchungen am Kaninchenmuskel korrelieren die Ausbeuten von Phosphorylase und Glycogen-Synthetase nicht mit der Ausbeute an Glycogen.
   In Gegenwart von ATP, Calcium und Magnesium läßt sich Phosphorylase blitzaktivieren, wenn auch im Vergleich zum Kaninchenmuskel wesentlich langsamer.

2. Aus Skelettmuskulatur chronisch urämischer Ratten läßt sich ebenfalls ein intakter Protein-Glycogen-Komplex isolieren mit einer Glycogen-Konzentration von 158.0 µg/mg Protein und einer Glycogenausbeute von 72%.
   Parallel mit der Isolierung dieser Organelle kommt es zu einem relativen Anstieg der Phosphorylase a-Aktivität sowie zu einem Anstieg der Ausbeute der Glycogen-Synthetase I auf 33%.

3. Aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten (60 Stunden nach Binephrektomie) läßt sich nach Verfütterung einer gemischten hochkalorischen, proteinarmen Diät (40 kcal/kg/24 h) in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser kein Protein-Glycogen-Komplex isolieren. Die zusätzliche Applikation von Propanolol (2.5 mg/kg/24 h s.c.) führt lediglich zu einer Ausbeute von 0.11 µg Glycogen/mg Protein 60 Stunden nach Binephrektomie und von 0.12 µg Glycogen/mg Protein 60 Stunden nach Ureterligatur.
Die Phosphorylase ist unter diesen Bedingungen mit einem aktiven Anteil von ca. 70% maximal stimuliert. Eine Blitzaktivierung des Enzyms durch Zugabe von ATP, Calcium und Magnesium ist unter diesen Bedingungen nicht mehr möglich.

4. Unter Applikation einer hochkalorischen, proteinarmen Diät in Kombination mit dem Ketosäurengemisch nach Walser und Propanolol läßt sich dagegen aus Skelettmuskulatur scheinoperierter Ratten ein intakter Protein-Glycogen-Komplex isolieren.
Die Glycogen-Konzentration beträgt 43.2 µg/mg Protein bei einer Ausbeute von 18%.

5. Nach Verfütterung hoher Dosen Serin (2 g/kg/24 h) in Kombination mit einer hochkalorischen, proteinarmen Diät, der Gabe von Propanolol und dem Ketosäurengemisch nach Walser gelingt aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten 60 Stunden nach Binephrektomie die Isolierung eines intakten Protein-Glycogen-Komplexes mit einer Glycogen-Konzentration von 134.3 µg/mg Protein und einer Ausbeute von 83%.
Dabei korrelieren die Aktivitäten von Phosphorylase und Glycogen-Synthetase gut mit den Glycogenkonzentra-

tionen während der einzelnen Isolierungsschritte. Nach Zusatz von ATP, Calcium und Magnesium läßt sich die Phosphorylase in diesem Protein-Glycogen-Komplex reversibel blitzaktivieren.

6. Die Erhöhung des Ketosäurengemisches von Walser auf 2 g/kg/24 h läßt lediglich einen Protein-Glycogen-Komplex in einer Konzentration von 14.0 µg Glycogen/mg Protein aus Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten isolieren.
   Die alleinige Gabe von hohen Dosen an Serin in Kombination mit der hochkalorischen Diät und Propanolol führt lediglich zu einem Protein-Glycogen-Komplex von 0.5 µg Glycogen/mg Protein.

7. Die Glycogen-Konzentration im Protein-Glycogen-Komplex korreliert bei den unterschiedlichen Bedingungen streng invers mit der Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase. So lassen sich die höchsten Konzentrationen an Glycogen pro mg Protein unter Bedingungen isolieren, wenn die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase möglichst hoch ist.
   Dagegen läßt sich eine derartige Korrelation für das antagonistische Enzym Phosphorylase-Kinase nicht erstellen.

8. Zusammen mit dem Protein-Glycogen-Komplex lassen sich Fragmente des sarkoplasmatischen Reticulums isolieren. Auffällig ist, daß die Calciumtransport-ATPase unter allen Isolierungsbedingungen mit einem Anteil von ca. 20% konstant ist.

9. Mittels SDS-Gelelektrophorese lassen sich in diesem Protein-Glycogen-Komplex neben Enzymen des Glycogenstoffwechsels, der Calciumtransport-ATPase sowie des Calsequestrins als Bestandteile des sarkoplasmatischen Reticulums auch kontraktile Proteine nachweisen wie die schwere Kette des Myosins und Aktin.

Herrn Professor Dr.med. A. Heidland danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Herrn Professor Dr.med. K. Kochsiek danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr.rer.nat. Dr.med. W. Hörl möchte ich in besonderem Maße danken, der durch seine Anleitung und kritische Diskussion zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Phosphorylase-Kinase erfolgen (13). Es ist gezeigt worden, daß Trypsin die Aktivität des Enzyms ca. 10-fach zu steigern vermag (14).

1.3. Definition der Ziele der vorliegenden Arbeit

1.3.1. Isolierung eines Protein-Glycogen-Komplexes (PGK) aus Rattenmuskulatur

Der Protein-Glycogen-Komplex stellt eine intracelluläre Struktur dar, deren Organisationsniveau zwischen frei im Zytoplasma gelösten Enzymen und Zellorganellen, wie Mitochondrien oder sarkoplasmatisches Reticulum, liegt.

Wie der Name schon zum Ausdruck bringt, besteht der Protein-Glycogen-Komplex aus Glycogen , den Enzymen des Glycogenauf- und-abbaus (Synthetase, Phosphorylase, Phosphorylase-Kinase, Phosphatasen und cAMP-abhängige Proteinkinase) (15).

Mit der Isolierung eines solchen Partikels erhält man ein weitgehend physiologisches Modell, das in besonders hohem Maß zum in-vitro-Studium geeignet erscheint. So lassen sich die Enzyme des Protein-Glycogen-Komplexes durch Effektorkonzentrationen halbmaximal aktivieren, die den intracellulären Verhältnissen entsprechen (15).

Dagegen genügen bei isolierten Enzymen schon Konzentrationen von Effektoren, die um den Faktor 100 niedriger liegen als den intracellulären Verhältnissen entspre-

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. LARNER, J.: Regulation of intermediary metabolism. Mechanism of regulation of glycogen synthesis and degradation.
Supp. 1, Circ. Res. 38: I -2, 1967

2. KILLILEA, S.D., H. BRANDT, E.Y.C. LEE, W.I. WHELAN:
Evidence for the coordinate control of activity of liver glycogen synthetase and phosphorylase by a single protein phosphatase.
J. Biol. Chem. 251: 2363, 1976

3. HELMREICH, E., C.F. CORY:
Regulation of glycogenolysis in muscle.
In: Advances in Enzyme Regulation, edited by G. Weber. New York: Pergamon Press, 3:91, 1965

4. HASSELBACH, W.: Release and uptake of calcium by the sarkoplasmic reticulum. In: Molecular Basis of Motility, edited by L.M.G. Heilmeyer, jr. et al., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 81, 1975

5. HUXLEY, H.E.: The structural basis of contraction and regulation in skeletal muscle. In: Molecular Basis of Motility, edited by L.M.G. Heilmeyer, jr. et al.,
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York,9, 1975

6. BERGSTRÖM, J., H. CASTENFORDS, E. HULTMAN, T. SILANDER:

The effect of surgery upon muscle glycogen in man.
Acta. Chir. Scand. 130: 1, 1965

7. BERGSTRÖM, J., E. HULTMAN:

Glycogen content of skeletal muscle in patients with renal failure.
Acta. med. Scand. 186: 177, 1969

8. HÖRL, W.H., A. HEIDLAND:

Glycogen metabolism in muscle in uremia.
Am. J. Clin. Nutr., in Druck I

9. DE FRONZO, R.A., D.D. TOBIN, I.W. ROWE, R. ANDRES:

Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin.
J. Clin. Invest. 62: 425, 1978

10. SCHMID, G., L. FRICKE, K. HEMPEL, A. HEIDLAND:

Erhöhter cAMP-Gehalt des quergestreiften Muskels bei chronischer Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wochsch. 100: 2397, 1975

11. HÖRL, W.H., J. SPERLING, A. HEIDLAND:

Enhanced glycogen turnover in skeletal muscle of uremic rats - cause of uncontrolled actomyosin ATPase?
Am. J. Clin. Nutr. 31: 1861, 1978

12. MATTHEWS, C., K.W. HEIMBERG, E. RITZ, B. AGOSTINI, J. FRITSCHE, W. HASSELBACH:

Effect of 1-25-dihydroxycholecalciferol on impaired calcium transport by the sarcoplasmatic reticulum in experimental uremia. Kidney Int. 11: 227, 1977

13. HÖRL, W.H., A. HEIDLAND:

Enhanced proteolytic activity - cause of protein catabolism in acute renal failure. Am. J. Clin. Nutr., in Druck II

14. GRAVES, I.D., T. HAYAKAWA, R.A. HOROWITZ, E. BECKMAN, E.G. KREBS:

Studies on the subunit structure of trypsin- Biochemistry 12: 580, 1973

15. WALSER, M.: Ketoacids in the treatment of uremia. Clin. Nephrol. 3: 180, 1975

16. MEYER, F., L.M.G. HEILMEYER, jr., R.H. HASCHKE, E.H. FISCHER:

Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. I. Isolation and characterization of the protein glycogen complex. J. Biol. Chem. 245: 6642, 1970

17. LOWRY, O.H., N.I. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.I. RANDALL:

Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951

18. MONTGOMERY, R.:

Determination of glycogen.
Arch. Biochem. Biophys. 67 : 378, 1957

19. FISKE, C.H., I. SUBBAROW:

The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 66 : 375, 1925

20. HEDRICK, I.L., E.H. FISCHER:

On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. I. Absence of classical vitamin B_6-dependent enzymatic activities in muscle glycogen phosphorylase.
Biochemistry 4 : 1337, 1965

21. THOMAS, I.A., K.K. SCHLENDER, I. CARNER:

A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-^{14}C-glucose.
Anal. Biochem. 25 : 486, 1968

22. DE MELS, L., W. HASSELBACH:

Acetyl phosphate as substrate for Ca^{2+} uptake in skeletal muscle microsomes.
J. Biol. chem. 246 : 4759, 1971

23. HÖRL, W.H., H.P. JENNISSEN, L.M.G. HEILMEYER, jr.:

Evidence for the participation of a Ca^{2+}-dependent protein kinase and a protein phosphatase in the Ca^{2+}-transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 1. Effect of inhibitors of the Ca^{2+}-dependent protein kinase and protein phosphatase.
Biochemistry 17 : 759, 1978

24. JENNISSEN, H.P., L.M.G. HEILMEYER, jr.:

An automated assay for phosphorylase kinase.
Anal. Biochem. 57 : 118, 1974

25. HEILMEYER, jr. L.M.G., F. MEYER, R. HASCHKE, E.H. FISCHER:

Control of Phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. II. Activation by calcium.
J. Biol. Chem. 245 : 6649, 1970

26. WEBER, K., M. OSBORN:

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244 : 4406, 1969

27. HURD, S.S., D. TELLER, E.H. FISCHER:

Probable formation of partially phosphorylated intermediates in the interconversions of phosphorylase a and b.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 : 79, 1966

28. HASCHKE, R.H., L.M.G. HEILMEYER, jr. F. MEYER, E.H. FISCHER:

Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. III. Regulation of phosphorylase phosphatase.
J. Biol. Chem. 245 : 6657, 1970

29. HICKENBOTTOM, J.P.:

Ph. D. thesis, University of Washington, 1967

30. PARMEGGIANI, A., J. H. LUFT, D.S. LOVE, E.G. KREBS:

Crystallization and properties of rabbitskeletal muscle phosphofructokinase.
J. Biol. Chem. 241 : 4625, 1966

31. HÖRL, W.H., L.M.G. HEILMEYER, jr.:

Evidence for the participation of a Ca^{2+} dependent protein kinase and protein phosphatase in the regulation of the Ca^{2+} transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 2. Effect of phosphorylase kinase and phosphorylase phosphatase.
Biochemistry 17 : 766, 1978

32. FOULKES, J.G., P. COHEN:

The hormonal control of glycogen metabolism, phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 invivo in response to adrenaline.
Eur. J. Biochem. 97, 251, 1979

33. DANFORTH, W.H., E. HELMREICH, C.F. CORI:

The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog satorius muscle.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48 : 1191, 1962

34. KREBS, E.G., D.S. LOVE, G.E. BRATVOLD, K.A. TRAYSER, W.L. MEYER, E.H. FISCHER:

Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase.
Biochemistry, 3 : 1022, 1964

35. POSENER, J.B., R. STERN, E.G. KREBS:

Effects of electrical stimulation and epinephrine on muscle phosphorylase, phosphorylase b kinase, and adenosin 3', 5'-phosphate.
J. Biol. Chem. 240 : 982, 1965

36. DRUMMOND, G.I., J.P. HARWOOD, C.A. POWELL:

Studies on the activation of phosphorylase in skeletal muscle by contraction and by epinephrine.
Biol. Chem. 244 : 4235, 1969

37. HEILMEYER, jr., L.M.G., U. GRÖSCHEL-STEWART, U. JANKE, M.W. KILIMANN, K.P. KOHSE, M. VARSANYI:

Novel aspects of skeletal muscle protein kinase and protein phosphatase regulation by Ca^{2+}.
Adv. Enzyme Regul. in press

38. TAO, S.H., F.L. HUANG, A. LYNCH, W.H., GLINSMANN:

Control of rat skeletal muscle phosphorylase phosphatase activity by adrenaline.
Biochem. J. 176 : 347, 1978

39. TOTH, G., P. GERGELY, H.K. PARSADANIAN, G. BOT:

Regulation of phosphorylase phosphatase from skeletal muscle by phosphorylation of a regulator protein.
Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 12 : 389, 1977

40. VARSANYI, M., L.M.G. HEILMEYER, jr.:

Ca^{2+} regulation of sarcoplasmic reticular protein phosphatase activity.
Biochemistry, im Druck

41. CANDWELL, B., J.F. ANTONIW, P. COHEN:

Calsequestrin, myosin and the components of the protein-glycogen complex in rabbit skeletal muscle.
Eur. J. Biochem. 86 : 511, 1978

Lebenslauf

Name:	Roland Michael Schaefer
geb. am:	18. 5. 1954 in Würzburg
Beruf:	Assistenzarzt
Familienstand:	ledig, ein Kind
Wohnung:	8700 Würzburg, Herrnstr. 1
Schulen:	1960 - 1964 Volksschule in Würzburg
	1964 - 1973 Röntgengymnasium in Würzburg
Abitur:	Juli 1973
Wehrdienst:	Oktober 1973 - April 1974 in Donauwörth
Studium:	SS 1974 - WS 1979/80 an der Julius-Maximillians-Universität Würzburg
Auslandsfamulatur:	Juli - August 1978 in HongKong am Queen-Mary-Hospital (chir. Abteilung)
Praktisch. Jahr:	April - Juli 1979 Neurologie an der Neurolog. Uniklinik Würzburg August - November 1979 Chirurgie an der Chirurg. Uniklinik Würzburg Dezember 1979 - März 1980 Innere Medizin am Landkrankenhaus Coburg
Medizinisches Staatsexamen:	29. 5. 1980
Approbation:	3. 6. 1980
Tätigkeit:	Assistent in der chirurg. Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Neustadt, seit dem 9. 6. 1980

Druckerei A. Staudenraus Würzburg